AL. VÎLCU

ERITROCITUL

EDITURA MEDICALĂ

ALEXANDRU VÎLCU
Clinica de hematologie,
Spitalul Fundeni București

ERITROCITUL

Morfologie, fiziologie, fiziopatologie

EDITURA MEDICALĂ — București, 1977

Scanned with OKEN Scanner

MOTTO:

„Ceux qui veulent opposer le laboratoire à la clinique et la clinique au laboratoire n'ont rien compris, ni au laboratoire ni à la clinique."

CHARLES RICHET

Scanned with OKEN Scanner

PREFAȚĂ

Intenția autorului a fost de a scrie o monografie a globulului roșu cu o adresabilitate cît mai largă. Acest lucru a determinat, pe de o parte, alegerea unui stil foarte explicit, iar pe de altă parte dorința de a oferi cititorului care dispune de puțin timp liber și căruia nu-i stă la îndemînă bibliografia complementară, datele necesare pentru înțelegerea globală a anumitor tehnicisme, în scopul de a-și facilita însușirea achizițiilor științifice ale cercetării biologice actuale. De aceea, înainte de a dezvolta cele trei etape ale existenței eritrocitare: nașterea, viața și moartea eritrocitului, în primul capitol sînt prezentate cîteva elemente de citologie și de genetică. Pe același considerent s-au introdus, pe parcursul expunerii, noțiuni menite să actualizeze unele date care nu intră în preocupările cotidiene ale unora dintre cititori, ca de exemplu, unele noțiuni de biochimie, imunologie, precum și cîteva tehnici moderne care au contribuit la saltul realizat în cunoașterea eritrocitului. Iconografia (dintre care unele schițe originale) a fost alcătuită în așa fel încît să țină locul altor zeci de pagini de text, iar datele expuse să poată fi reținute mai ușor și pentru un timp mai îndelungat. Trimiterile la diferite alte capitole, pentru completarea datelor legate de aceeași problemă, precum și recurgerea la indexul alfabetic, permit o economie de timp și spațiu subliniind, totodată, raporturile care există între datele științifice fundamentale și cele legate de practica medicală.

Eritrocitul, la prima vedere un minuscul balon încărcat cu hemoglobină, cărăuș de oxigen propulsat de contracția

Scanned with OKEN Scanner

cardiacă, a ascuns o infinitate de secrete care, datorită progreselor biochimiei, ale biofizicii, ale geneticii și ale altor ramuri moderne ale științelor exacte, sînt pe cale de a fi dezvăluite rînd pe rînd. Această celulă ultraspecializată, lipsită de nucleu și de organite citoplasmatice, fără capacitate de sinteze și posedînd un metabolism simplificat, fără să dispună de căi metabolice de compensare în caz de dereglare, este de neînlocuit pentru buna funcționare a organismelor. Dovadă în acest sens sînt mecanismele foarte fine de reglare ale dinamicii celulare în menținerea homeostaziei, una din cele mai precise din organism. Legile care guvernează funcțiile eritrocitare sînt legile tuturor viețuitoarelor acestei lumi, de la cele inframicroscopice, la cele evoluate. Dezvăluirea principiilor de funcționare a eritrocitului permite înțelegerea funcționării tuturor celulelor din organism și din mediul înconjurător.

În încheiere se exprimă speranța că, după cum eritrocitul circulă peste tot, alimentînd cu oxigen sistemele celulare ale organismului, la fel și monografia care i-a fost consacrată să aibă o circulație în rîndurile medicilor practicieni contribuind la documentarea lor profesională cu date clasice și moderne de hematologie.

AUTORUL

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINS

Pag.

Prefață 5

CAPITOLUL 1

ELEMENTE DE BIOLOGIE CELULARĂ 11

I. ELEMENTE DE CITOLOGIE 11

A. Tehnici uzuale și tehnici moderne de investigație celulară 11

1. Tehnici de microscopie 13
2. Tehnici citologice nemicroscopice 18

B. Structura celulară 20

1. Membrana celulară 20
2. Citoplasma 25
3. Nucleul și înmulțirea celulară 32

II. ELEMENTE DE GENETICĂ 41

A. Noțiuni de genetică moleculară 41

1. Noțiuni de bază despre structura protidelor 42
2. Acizii nucleici 46
3. Transferul informației genetice 52
4. Conceptul de genă și ereditate cromozomială 60

B. Introducere în problematica bolilor ereditare ale eritrocitului 70

1. Caracterele principale și clasificarea bolilor ereditare eritrocitare 70
2. Profilaxia și problemele medico-sociale ale bolilor ereditare 71

CAPITOLUL 2

ERITROPOIEZA 74

I. MORFOLOGIA ȘI DINAMICA ERITROPOIEZEI 75

A. Caracterele macro- și microscopice ale organului hematopoietic 75

1. Eritropoieza prenatală 75
2. Eritropoieza postnatală 79

B. Dinamica eritropoiezei 93

1. Țesutul hematopoietic, componentă a „SRH" 94
2. Funcțiile medulare (înmulțirea, maturarea și diabaza) 95
3. Reacții patologice ale măduvei hematogene 103
4. Reglarea eritropoiezei 111

II. MIJLOACE DE EXPLORARE A ERITROPOIEZEI 116

A. Mijloace directe 118

1. Puncția medulară 118
2. Puncția biopsie osoasă 126

B. Mijloace indirecte 131

1. Determinarea volumului sanguin 131
2. Constante și indici eritrocitari 133
3. Alte procedee indirecte de explorare a eritropoiezei 144

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL 3

Pag.

MORFOLOGIA ŞI STRUCTURA ERITROCITULUI CIRCULANT 146

I. MEDIUL CIRCULANT AL ERITROCITULUI 146

A. Proprietăţile generale ale sîngelui 146

1. Volumul sanguin 146
2. Constantele fizice ale sîngelui 149
3. Plasma sanguină 152

B. Circulaţia terminală 155

1. Sistemul capilar şi lacunar 155
2. Circulaţia intrasplenică 158
3. Noţiuni de hemoreologie 158

II. ERITROCITUL NORMAL 160

A. Morfologia şi structura eritrocitară 161

1. Morfologia eritrocitară 161
2. Structura eritrocitară 165

B. Antigenele eritrocitare 174

1. Sistemul ABO 177
2. Sistemul Rhesus (Rh) 180
3. Alte sisteme de grup sanguin 182

III. ERITROCITUL PATOLOGIC 186

A. Modificări dimensionale şi morfologice 186

1. Variaţii de mărime 186
2. Variaţii de culoare 190
3. Variaţii de formă 191

B. Incluzii eritrocitare 202

1. Persistenţa nucleilor sau a resturilor nucleare 202
2. Vestigii ale imaturităţii citoplasmei 204
3. Agregate de hemoglobină instabilă 210
4. Incluzii metalice 214
5. Corpi intraeritrocitari de natură extrinsecă 215

CAPITOLUL 4

METABOLISMUL ERITROCITAR 217

I. CUPLAREA METABOLISMULUI ERITROCITAR ÎN METABOLISMUL GENERAL . . 217

A. Procese metabolice celulare de bază 217

1. Constituenţii fundamentali ai organismului 218
2. Energia celulară 220

B. Vitamine cu rol în eritropoieză 226

1. Acidul folic (pteroilglutamic) 226
2. Vitamina B_{12} (ciancobalamina) 232
3. Vitamina B_6 (piridoxina) 236
4. Vitamina C (acidul ascorbic) 237

C. Funcţia respiratorie a eritrocitelor 238

1. Schimbul de gaze respiratorii 239
2. Curbele de disociere ale oxihemoglobinei 242

Scanned with OKEN Scanner

Pag.
3. Succesiunea biochimică a schimburilor gazoase 244
4. Tulburări ale funcției respiratorii a eritrocitelor 245

II. PROCESE METABOLICE CORELATE CU FUNCȚIILE ERITROCITARE 249

A. Principalele procese metabolice ale eritrocitului 249
1. Glicoliza 252
2. Calea oxidativă a pentozei 256
3. Sinteza glutationului și menținerea lui sub formă redusă 258
4. Coenzimele reductoare și diaforazele 260
5. Alte sisteme enzimatice eritrocitare 262

B. Consecințele metabolice ale catabolismului eritrocitar 263
1. Reducerea methemoglobinei 263
2. Homeostazia compușilor ionici („pompa de sodiu" a eritrocitului) 263
3. Menținerea formei discoidale a eritrocitului 265

CAPITOLUL 5

HEMOGLOBINA 268

I. COMPONENTA PROSTETICĂ A HEMOGLOBINEI: HEMUL 268

A. Structura și biosinteza porfirinelor 268
1. Structura chimică a porfirinelor 270
2. Biosinteza porfirinelor 273
3. Legătura dintre protoporfirină și fier 277

B. Tulburări în sinteza hemului 278
1. Clasificarea și patogenia porfiriilor 278
2. Clasificarea și patogenia anemiilor hipocrome 279

C. Tehnici de laborator utilizate în patologia hemului 281
1. Tehnici de diagnostic al porfirinelor și al precursorilor porfirinici 281
2. Tehnici de diagnostic al anemiilor hipocrome 282

II. COMPONENTA PROTEICĂ A HEMOGLOBINEI: GLOBINA 284

A. Structura chimică și evoluția ontogenetică a globinelor umane 284
1. Structura chimică a moleculelor de globină 285
2. Legătura dintre hem și globină 290
3. Evoluția ontogenetică a globinelor umane 292

B. Hemoglobinoze 295
1. Clasificarea hemoglobinozelor 296
2. Patogenia hemoglobinozelor 298
3. Genetica biosintezei globinelor 314

C. Tehnici de laborator utilizate în patologia hemoglobinică 319
1. Tehnici electroforetice 320
2. Tehnici neelectroforetice 324

CAPITOLUL 6

METABOLISMUL FIERULUI 327

I. COMPUȘII FERUGINOȘI DIN ORGANISM 328

A. Fierul heminic 329
1. Compușii transportori și acumulatori de oxigen: hemoglobina și mioglobina (vezi și cap. 5) 330

Scanned with OKEN Scanner

Pag.
2. Enzime cu rol în respirația celulară 331
B. Fierul neheminic 332
1. Fierul plasmatic 332
2. Fierul de rezervă 339
3. Enzime neheminice (flavoproteinele) 344
II. APORTUL, ABSORBȚIA, CIRCULAȚIA ȘI ELIMINAREA FIERULUI DIN ORGANISM 344
A. Aportul de fier 345
1. Conținutul în fier al alimentelor și băuturilor 345
2. Nevoile de fier ale organismului 345
B. Absorbția intestinală a fierului 348
1. Metode de măsurare a absorbției fierului 348
2. Factori favorizanți și inhibitori ai absorbției fierului 349
3. Locul și mecanismele biochimice ale absorbției fierului 352
C. Mișcarea și eliminarea fierului din organism 356
1. Ferokinetica 356
2. Căile de eliminare a fierului din organism 365
3. Recapitularea cifrică a principalelor constante sanguine care interferează cu metabolismul fierului 366

CAPITOLUL 7

HEMOLIZA 368
I. DEZINTEGRAREA ERITROCITARĂ 368
A. Mecanisme de hemoliză *in vitro* și *in vivo* 369
1. Alterarea eritrocitară fiziologică 369
2. Mecanisme experimentale de hemoliză 372
3. Eritrofagocitoza 375
4. Alterări eritrocitare patologice 383
B. Noțiuni de imunologie 392
1. Complexele imune 392
2. Noțiuni de imunogeneză 400
C. Catabolismul hemoglobinei și biosinteza pigmenților biliari 407
1. Catabolismul intravascular al hemoglobinei 407
2. Catabolismul intracelular al hemoglobinei 411
II. METODE DE EVALUARE A DISTRUCȚIEI ERITROCITARE 424
A. Teste de evaluare a hiperregenerării sanguine 424
1. Teste de evaluare a hiperregenerării la nivelul măduvei 424
2. Teste de evaluare a hiperregenerării la nivelul sîngelui periferic 424
3. Teste de ferokinetică 424
B. Teste de evaluare a distrucției eritrocitare 424
1. Teste de evaluare a distrucției eritrocitare „intravasculare" 424
2. Teste de evaluare a distrucției eritrocitare „intracelulare" 425
3. Teste de evaluare a rezistenței eritrocitare 425
4. Teste imunologice de evaluare a hemolizei 429
5. Determinarea duratei de viață a eritrocitelor 433
C. Anexă: Determinarea grupelor sanguine 439
1. Determinarea grupelor sanguine în sistemul ABO 439
2. Determinarea antigenelor din afara sistemului ABO 440
BIBLIOGRAFIE 444
INDEX ALFABETIC 457

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 1

ELEMENTE DE BIOLOGIE CELULARĂ

Celula este unitatea de bază a vieții. Fiecare organ sau țesut reprezintă un agregat de celule, unele cu aceeași morfologie și funcție, altele cu forme și roluri diferite, specializate pe principiul „diviziunii muncii". Toate celulele au strînse interrelații funcționale, coroborînd la unitatea organismului. În nucleul fiecărei celule este înscris, în cele mai fine amănunte, „proiectul" viitorului organism pe toată perioada dezvoltării sale, începînd cu gestația, continuînd cu structura și funcțiile celulare și terminînd cu modul în care trebuie să dispară. Cu cît ființele din regnul animal sau vegetal sînt mai complicate, cu atît celulele care le alcătuiesc sînt adaptate la funcții din ce în ce mai specializate; o celulă diferențiată actualizează numai anumite „inscripții" din codul genetic, înscris absolut identic în miliardele de celule ale organismului.

Deși unei celule îi este proprie o membrană, o citoplasmă și un nucleu, unele fac excepție de la această alcătuire (eritrocitele, bacteriile etc.), cu toate că principiul de bază al metabolismului lor este identic cu al celulelor adevărate.

Eritrocitele reprezintă una dintre cele mai numeroase varietăți celulare ale organismului uman; ele se găsesc în număr de circa 25 de trilioane, ceea ce reprezintă aproximativ 1 : 40 față de totalul celulelor unui om adult.

I. ELEMENTE DE CITOLOGIE

A. TEHNICI UZUALE ȘI TEHNICI MODERNE DE INVESTIGAȚIE CELULARĂ

Celula este partea cea mai mică a materiei vii. „Structura și metabolismul celular sînt două aspecte ale aceluiași fenomen" (G. Palade). Studierea morfologiei și fiziologiei celulelor sanguine se datorează, în

Scanned with OKEN Scanner

primul rînd, progreselor tehnice. De la microscopul optic simplu și frotiul sanguin colorat clasic, medicina a progresat considerabil. Acest progres a fost posibil datorită contribuției directe sau indirecte a fizicienilor, chimiștilor, biologilor, matematicienilor, inginerilor și altor specialiști din domenii paramedicale, în urma căreia beneficiază omul suferind. Medicina astăzi n-ar mai putea progresa exclusiv la patul bolnavului. În spatele semiologului care culege de la bolnav date anamnestice, aplicînd observația, palpația, percuția și ascultația, funcționează — cel puțin în anumite spitale — adevărate „uzine", în care sînt studiate eșantioanele sanguine; însuși bolnavul este supus unor investigații foarte complexe și variate.

Cu toată existența sectoarelor de cercetare, modern utilate și cu personal ultraspecializat, care călăuzesc pașii medicinei practice, omul bolnav se adresează medicului de circumscripție sau de policlinică care este primul factor care face discernămînt asupra atitudinii de urmat. Microscopul optic și frotiul sanguin, care pentru unele cabinete medicale reprezintă unica aparatură, este „primum movens" chiar și pentru laboratoarele ultramoderne de cercetare.

Chiar dacă cititorul acestei cărți nu lucrează personal cu culturi de țesuturi, cu microscoape electronice sau altă aparatură modernă, el trebuie să fie familiarizat cu principiile și avantajele pe care acestea i le pot aduce. Aici nu prezentăm date tehnice de specialitate, pe care cititorul le găsește în bibliografia recomandată sau în cărțile actualizate, bogate în detalii, ci doar principiile și avantajele acestor tehnici, precum și interpretarea rezultatelor furnizate de ele, cu scopul de a înțelege mai bine etapa de lucru a medicinei actuale.

Scurt istoric. Deși sîngele este cunoscut din cele mai vechi timpuri ca un component dinamic pentru organism, pînă la mijlocul secolului al XVII, nimeni nu a presupus existența eritrocitelor. În 1615 Jean du Pont vede cu microscopul lui „muștele care apar mari, ca viteii, acoperite de peri și avînd ghiare puternice". Descoperirea celulei este legată de dezvoltarea unei ramuri a fizicii, optica și, o dată cu ea, descoperirea microscopului. Malpighi, Swammerdan și Leeuwenhoek au fost printre pionierii care au explorat viețuitoare de sute de ori mai mici decît limita de percepție a ochiului. Fizicianul englez R. Hooke a fost cel care a folosit pentru prima dată, în 1665, termenul de celulă după „cămăruțele" pe care le-a văzut în textura plutei (cuv. lat. *cella*=cămară, *cellula*=cămăruță), prezența membranei delimitîndu-le sub forma unui fagure. În aceeași epocă biologul italian M. Malpighi (1628—1694), fondatorul histologiei umane, a arătat că viețuitoarele sînt alcătuite din formațiuni microscopice, separate de pereții membranoși.

Părintele hematologiei poate fi considerat țesătorul olandez Anton Leeuwenhoek (1632—1723), un „Galileu al microscopului"; el a descris pentru prima dată în 1683 eritrocitele de broască, apoi propriile sale eritrocite. Leeuwenhoek trimitea cu regularitate Academiei regale din Londra scrisori în care relata observațiile sale. În scrisoarea din 7 aprilie 1676 scrie între altele: „De multe ori am căutat să văd în ce constă sîngele. Mi-am scos o picătură din degetul propriu și am constatat că era format din mici globule rotunde amestecate într-un lichid transparent". Însăși regina Ana a Angliei și țarul Petru cel Mare au vizitat faimosul microscop și au văzut „globulele roșii". El a construit aproape 300 de microscoape, toate cu o singură lentilă.

Microscopul beneficiază în secolul următor de numeroase ameliorări tehnice. La sfîrșitul secolului al 18-lea și începutul secolului al 19-lea se pun bazele biologiei moderne. Wolff (1758) arată că viețuitoarele provin dintr-un element simplu, oul, care reprezintă tot o celulă. Pander și Baer analizează problema diferențierii

Scanned with OKEN Scanner

celulare. Brown (1831) descrie nucleul şi mişcarea moleculelor din masa celulară (mişcarea browniană). Botanistul Schleiden şi zoologul Schwann elaborează teoria celulară (1838).

Prin perfecţionarea tehnicilor microscopice, în cea de-a doua jumătate a secolului trecut şi începutul secolului nostru, se dezvoltă ramuri noi ale ştiinţei biologice: citologia, histologia, embriologia, bacteriologia etc. de pe urma cărora profită din plin medicina, ajungîndu-se la etapa clasică a ştiinţelor biologice. Această etapă este legată de numele lui Remak, Virchow, Ramon y Cajal, Golgi, Mecinicov, Schultze etc. Un rol deosebit în dezvoltarea teoriei celulare, l-a avut savantul german Rudolf Virchow (1821—1902) fondatorul anatomiei patologice; acesta a combătut generaţia spontanee ca „erezie pură şi operă a diavolului" şi parafrazînd pe Harvey („Omne vivum ex vivo") a emis aforismul „Omnis cellula e cellula" (251).

Bizzozero arată că „globulele roşii" se formează în măduva oaselor, Funke izolează hemoglobina, iar Hoppe-Seyler arată că acestea posedă proprietatea de a se încărca şi descărca cu oxigen, explicîndu-se astfel funcţia eritrocitelor.

Paul Ehrlich (1877) este fondatorul hematologiei morfologice (106). Ca urmare a studiilor sale asupra coloranţilor pe bază de anilină (industrie ce se dezvoltă în acea perioadă în Germania), tehnica observaţiilor microscopice se perfecţionează; un număr mare de medici se ocupă de celulele sanguine şi se descoperă că ele au o patologie proprie.

Între 1900 şi 1930 se pun bazele hematologiei clinice (Naegeli, Ferrata, Jolly, Downey, Maximov). Afirmaţia marelui clinician Trousseau care scria: „patologia celulară face să uitaţi fiinţa umană, vă gîndiţi numai în termeni celulari, pierzîndu-vă astfel într-un abis infinit de mic", nu trebuie înţeleasă ca o vedere retrogradă, ci ca un îndemn de a nu pierde niciodată din vedere omul bolnav.

Microscopia optică clasică, nesecundată de alte tehnici complementare, începe să ajungă la limitele ei spre sfîrşitul primei jumătăţi a secolului nostru. Pentru a înţelege cît mai cuprinzător fenomenele vieţii, se simte nevoia de a studia ultrastructura şi modul de organizare tisulară şi celulară pe plan molecular. Acest lucru necesită cunoaşterea structurii materiei şi a interacţiunii atomilor în molecule. Dezvoltarea fizicii şi a chimiei au perfecţionat metodele de investigaţie biologică, transformînd domeniul de cercetare de la nivel celular la nivel molecular. După 1940, o dată cu descoperirea microscopului electronic, s-a făcut un alt salt înainte prin descifrarea rolului fiziologic al unor structuri celulare (mitocondrii, lizozomi etc.), descoperindu-se în acelaşi timp şi alte formaţii submicroscopice cu rol de bază în viaţa celulară (ribozomii). Pe lîngă microscopia electronică s-au creat şi alte tehnici care au elucidat, în mare parte, modul de funcţionare a acestei „maşini mici", iar, cu cît se pătrunde mai adînc în labirintul structural al celulei, cu atît mai complexe apar structurile şi funcţiile sale. În timp ce microscopia optică obişnuită şi chiar microscopia electronică studiază „cadavre celulare", microscopia în contrast de fază cercetează celula în stare vie, aflată în ansamblul ei în continuă mişcare şi transformare, ca, de altfel, întreaga natură înconjurătoare (245), iar microscopul stereoscan redă imaginile în relief, dar numai la nivelul suprafeţelor.

Harris (încep. sec. XIX), dar mai ales Alexis Carrel (încep. sec. XX) utilizează culturile de ţesuturi, care au găsit ulterior aplicaţii importante în hematologie.

Unele detalii în legătură cu istoricul hematologiei vor fi prezentate la diverse capitole din partea specială a lucrării.

1. TEHNICI DE MICROSCOPIE

În hematologie medicul trebuie să ştie „să privească" nu numai bolnavul, ci — prin intermediul lentilelor — şi celulele care alcătuiesc sîngele acestuia. Studierea celulelor sanguine, împreună cu examenul clinic, formează baza de investigare a bolnavilor cu afecţiuni de sistem. Este util ca frotiul sanguin sau medular „citit" de medicul de laborator

Scanned with OKEN Scanner

să fie examinat — cel puţin la unii bolnavi — şi de către clinician care, numai astfel poate face legătura între ceea ce a văzut şi a auzit de la bolnav şi ceea ce „relatează" testările paraclinice. Spre deosebire de alte organe unde biopsia este aplicată cu o frecvenţă variabilă din cauza dificultăţilor tehnice, vizualizarea microscopică a ţesutului sanguin este una din tehnicile cel mai frecvent aplicate în investigaţiile de laborator actuale.

Dincolo de microscopia obişnuită, tehnica măririlor a progresat considerabil. După o serie de perfecţionări în gama luminii vizibile, electronica a permis trecerea cu mult dincolo de barierele spectrului luminos (50).

a. **Microscopia în spectrul vizibil**

1) *Microscopia optică obişnuită.* Cea mai uzuală metodă de examinare în citologia şi histologia hematologică este examinarea elementelor figurate sanguine şi a precursorilor acestora cu ajutorul microscopului clasic în lumina vizibilă. Prin intermediul microscopului optic se pot obţine măriri cuprinse pînă la 1 000—1 500 de ori; peste aceste valori imaginile încep să fie neclare. Aceste măriri corespund cu o putere de separare (cea mai mică distanţă la care două puncte sînt percepute distinct) de circa 0,2 μ. În ultimul timp au fost create dispozitive speciale de echipare a microscopului optic cu ajutorul cărora pot fi văzute particule şi mai mici; aceste tehnici sînt cunoscute sub denumirea de:

— *ultramicroscopie,* bazată pe iluminarea laterală a unor particule pe fond negru aflate în suspensie coloidală în soluţie (fenomenul Tyndall), cu putere de rezoluţie pînă la 0,1 μ şi

— *microscopie în lumină polarizată,* bazată pe fenomenul birefringenţei, cu posibilităţi de diferenţiere a structurilor şi ultrastructurilor celulare cu indici de difracţie diferiţi (60).

2) *Microscopul cu contrast de fază,* descoperit în 1942 de către olandezul Zernike, a dus la o cunoaştere mai bună a celulei. Spre deosebire de microscopul obişnuit care, prin folosirea tehnicilor de fixare, studiază celule moarte, microscopul cu contrast de fază permite studierea celulei în stare vie, nealterată prin fixare. Celula vie necolorată, privită la microscopul optic obişnuit, apare ca o mică masă sticloasă în interiorul căreia se pot distinge puţine detalii (nucleul şi eventual cîteva mitocondrii). Principiul microscopului cu contrast de fază se bazează pe transformarea diferenţelor de refringenţă, în diferenţe de luminozitate, evidenţiind astfel o serie de elemente infrastructurale ale celulei, inaparente la microscopia obişnuită.

3) *Microscopul cu interferenţă* măreşte şi mai mult decît microscopul cu contrast de fază decalajul de fază al razelor luminoase ce străbat un preparat, dînd posibilitatea unor măsurători precise a particulelor biologice. *Sistemul Nomarski* oferă în plus imagini agreabile ochiului, de exemplu eritrocitelor le elimină haloul, permiţînd studierea unor preparate mai groase decît prin contrast de fază.

4) *Microcinematografia* studiază celula, atît în spaţiu, cît şi în timp, putînd urmări desfăşurarea dinamică a diferitelor procese ce-

Scanned with OKEN Scanner

lulare. Cu ajutorul unui aparat de filmat cu viteză normală, accelerată sau încetinită, se pot urmări toate etapele naşterii, vieţii (mişcări, transformări) şi ale morţii celulare (fagocitare, dezagregare), precum şi dinamica subunităţilor celulare. Această tehnică se utilizează mai ales prin adaptare la microscopul cu contrast de fază. Pentru reacţiile celulare lente se utilizează a redare accelerată (de 30 pînă la 60 000 de ori); imaginile sînt luate la intervale de o secundă pînă la 30 de minute. Invers, pentru reacţiile celulare rapide, redarea încetinită permite observarea diferitelor procese biologice rapide, aproape explozive, de exemplu unele varietăţi de hemoliză (32).

b. **Microscopia cu radiaţii invizibile**

1) *Microscopul cu raze ultraviolete* utilizează, în locul razelor luminoase, această zonă invizibilă a spectrului, avînd ca sursă emiţătoare de fascicule invizibile o lampă cu vapori de mercur sau o lampă cu arc voltaic şi filtre (tip Wood). Sistemul său optic este format din lentile de cuarţ, transparente pentru aceste raze (deoarece sticla obişnuită este opacă pentru razele ultraviolete). Întrucît aceste raze nu pot fi percepute de ochiul liber, imaginile se imprimă pe placa fotografică.

Pentru cercetarea eritrocitului, microscopia în ultraviolet ajută la analiza cantitativă şi calitativă a hemoglobinei şi a bazelor purinice şi pirimidinice din acizii nucleici, care prezintă o puternică absorbţie în ultraviolet. Curba de absorbţie determinată pentru anumite lungimi de undă permite localizarea şi evaluarea cantitativă a acestor substanţe în anumite zone ale celulei (fig. 1-1). Microscopul cu raze ultraviolete este, de asemenea, amplu utilizat pentru studierea preparatelor tratate cu substanţe fluorescente cît şi pentru evidenţierea fluorescenţei unor ţesuturi patologice (porfirii).

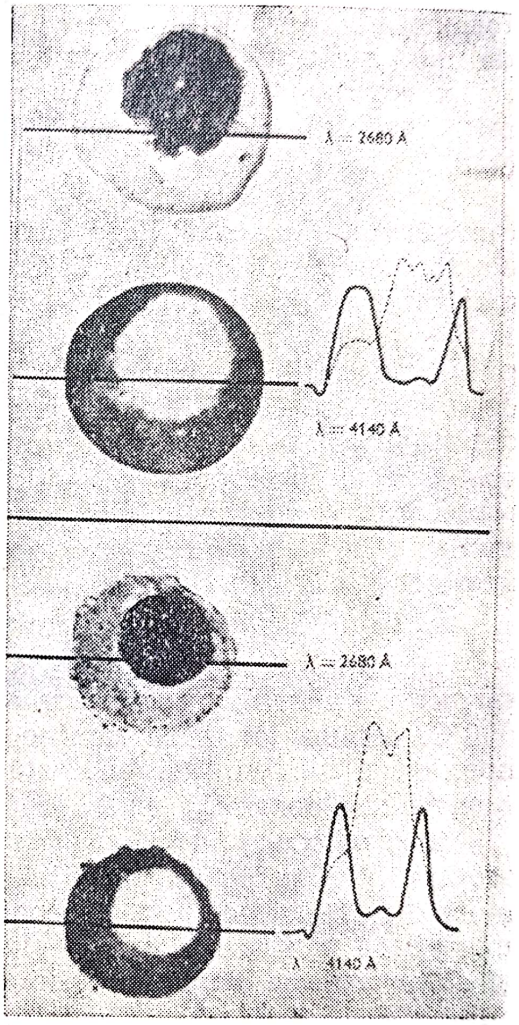


Fig. 1-1. Microscopie în ultraviolet (după M. Bessis, 1966).

Proeritroblaşti (sus) şi eritroblaşti bazofili (jos) fotografiaţi şi „măsuraţi" la microspectrofotometru de-a lungul liniei trasate peste centrul celulei. Curba punctată indică absorbţia la lungimea de undă de 2 680 Å, maximală pentru acizii nucleici; curba cu linie continuă indică absorbţia la lungimea de undă de 4 140 Å, maximală pentru hemoglobină.

2) *Microscopia cu raze X.* Spre deosebire de restul spectrului electromagnetic, razele X nu pot fi manipulate de nici unele din mijloacele microscopiei optice, ele nu pot fi focalizate prin lentile. Totuşi

Scanned with OKEN Scanner

s-au dezvoltat căi practice de efectuare de fotografii ale unor obiecte microscopice, iar unele din acestea au abordat studierea celulei.

3) *Microscopia electronică,* deşi vizualizează structurile static, are avantajul unei foarte importante puteri de mărire, permiţînd observarea unor particule mai mici de 10 Å (0,001 microni). Această performanţă a fost posibilă prin utilizarea radiaţiilor electronice (cu lungime de undă mult mai mică decît a celor fotonice). Dacă imaginile obţinute cu microscopul optic depăşesc cu greu mărirea de 1 000 de ori, cu ajutorul microscopului electronic se pot obţine măriri de peste 500 000 de ori (239, 264).

4) *Stereoscanul* este un microscop care realizează imagini tridimensionale ale celulelor intacte; el combină principiul microscopiei electronice cu al televiziunii. Stereoscanul poate mări de circa 500 de ori mai mult decît microscopul optic. Puterea de separare a microscopului optic este de circa 2 500 Å, a stereoscanului de circa 200 Å, iar a microscopului electronic de circa 5 Å. Deşi are o putere de separare mai mică decît a microscopului electronic, stereoscanul dă imagini mai fidele ale detaliilor de suprafaţă şi are avantajul de a reda imaginile în relief. Cu toate că nu este posibilă evidenţierea directă a structurii intracelulare, totuşi, după disecţia celulei, sau după izolarea nucleului, sau a unor organite celulare, se pot pune în evidenţă, tridimensional, detaliile fine ale acestora (277, 330).

c. **Tehnici speciale de prelucrare a preparatelor microscopice**

1) *Microincinerarea* se foloseşte pentru studierea distribuirii sărurilor minerale pe preparatele microscopice prin incinerare la 250—550°C; cenuşa lor, care rămîne pe loc, se acoperă cu o peliculă de monooxid de silicon. Prin această tehnică pot fi bine analizate mai ales nucleul şi ribozomii.

2) *Coloraţia negativă.* Puterea mare de separare a microscopului electronic nu permite totdeauna evidenţierea contrastelor dintre molecule. De aceea, s-a preconizat stropirea preparatului cu o peliculă mai opacă pentru fasciculele electronice. Astfel, organitele citoplasmatice şi chiar macromoleculele apar albe pe fond negru. Această tehnică permite vizualizarea particulelor foarte mici (feritina, macroglobulina, fibrinogenul, catalaza) sau ale virusurilor mici.

3) *Umbrirea frotiului sanguin.* Pe un frotiu, grosimea celulelor şi neregularităţile suprafeţei acestora nu pot fi apreciate cu precizie. Luminate dintr-un anumit unghi ele aruncă o umbră proporţională ca lungime cu înălţimea lor (fig. 1-2).

4) *Criodecaparea* este o tehnică prin care microparticulele sînt îngheţate la temperaturi foarte coborîte (circa —100°C), după care preparatul este fracturat cu un gen de daltă (fig. 1-3). Fracturarea poate avea loc, fie la exteriorul obiectului, punîndu-se în evidenţă suprafaţa unei celule, a nucleului sau a organitelor, fie în interiorul acestuia (20, 25, 185).

5) *Fluorescenţa.* O substanţă este fluorescentă dacă lumina pe care o absoarbe de la o sursă (lumina de excitaţie) o retransmite prin-

Scanned with OKEN Scanner

tr-o lungime de undă superioară. Această proprietate nu durează decît o fracțiune dintr-o secundă; dacă durează mai mult fenomenul se numește fosforescență (81, 183). Dintre substanțele care produc *fluorescență* (fluorocromi) amintim albastrul de anilină, oranjul de acridină, fluoresceina și rodamina. Lumina de excitație este furnizată de o sursă puternică (lampă cu arc voltaic sau cu vapori de mercur) filtrată prin filtre spe-

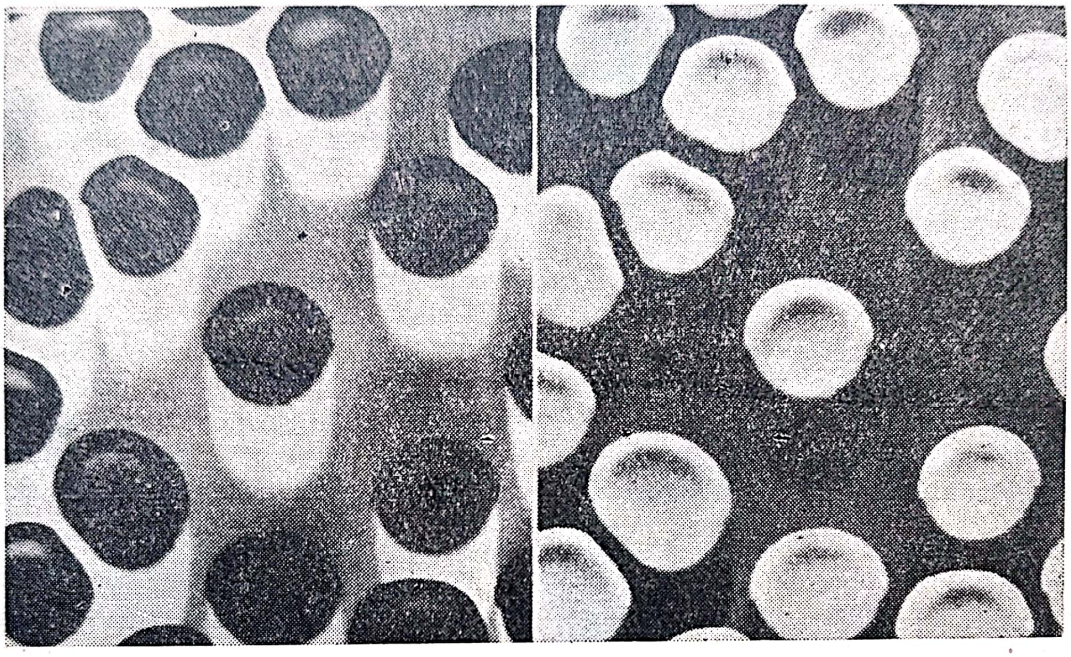


Fig. 1-2. Eritrocite de pe un frotiu sanguin umbrite cu săruri de aur coloidal și privite la microscopul optic (după M. Bessis, 1973).

La stînga, frotiul umbrit, privit la microscopul optic; la dreapta, aceeași imagine după inversiune fotografică, umbra apărînd aici în negru.

Principiul de umbrire constă în următoarele: în camera în care sînt montate preparatele se creează vid, apoi, printr-o pompă așezată într-un unghi anumit (circa 15°), se răspîndesc cîteva mg de aur coloidal sau un alt metal. Neregularitățile create de nucleu, organitele citoplasmatice sau conturul celulei opresc răspîndirea soluției, iar umbra apare albă; prin tehnica reversibilității umbra este retransformată în negru.

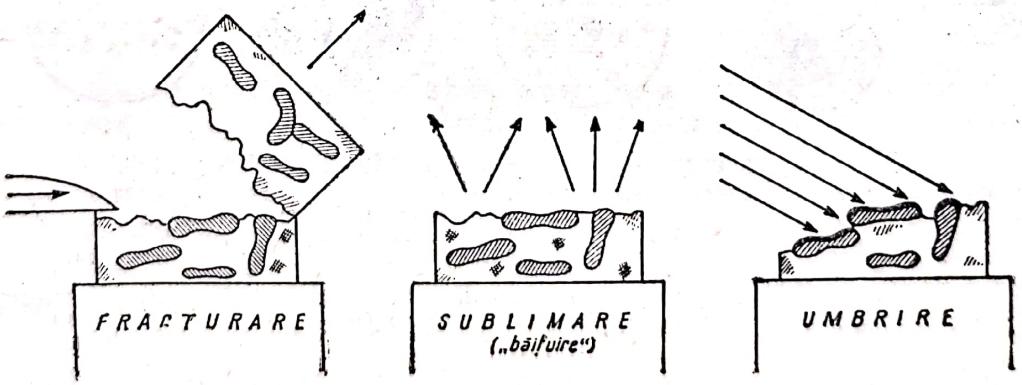


Fig. 1-3. Reprezentare ilustrativă a tehnicii criodecapajului (după M. Bessis, 1973).

Preparatul, după ce a fost înghețat la temperatura azotului lichid, este fracturat; detaliile denudate de fractură sînt acoperite cu o peliculă protectoare, apoi umbrite cu un înveliș de aur-paladiu, pentru a fi mai bine scoase în relief, iar mulajul este examinat la stereoscan.

ciale. Tehnica fluorescenței are o mare utilizare în imunologie (imunofluorescență). O contribuție importantă în realizarea acestei tehnici a adus-o Coons în 1939.

2. TEHNICI CITOLOGICE NEMICROSCOPICE (156, 185)

a. **Ultracentrifugarea** constă în obținerea unor subunități celulare (nuclei, mitocondrii, ribozomi etc.), izolate prin centrifugarea dozată cu păstrarea, în cea mai mare parte, a structurii lor funcționale. Metoda constă în dezagregarea „arhitecturii" celulare, prin broiaj, cu respectarea integrității organitelor, urmată de separarea lor prin centrifugare pe baza diferențelor de densitate (fig. 1-4).

b. **Microdisecția celulară** deși se practică de peste 100 de ani, în zilele noastre a deschis noi perspective de studiere a celulei. S-au imaginat numeroase tipuri de micromanipulatoare la care acele, bisturiile și pipetele sînt dirijate după principiul pîrghiilor acționate pneumatic, hidraulic, electric sau prin mișcarea mîinilor. În ultimul timp s-au putut obține și adaptări electronice și la televiziunea cu circuit închis. Principalele aplicații ale microchirurgiei sînt: izolarea unei singure celule (sanguine, tumorale, bacterie, spori), studierea adezivității și a rezistenței celulare, transplantare și eliminare de nuclei, de nucleoli, de cromozomi, de orga-

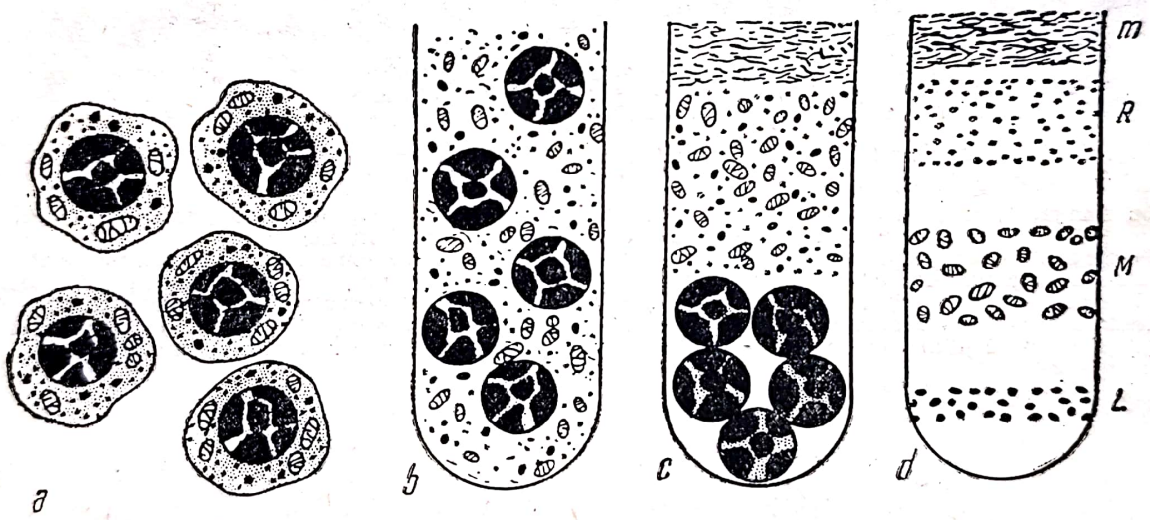


Fig. 1-4. Ultracentrifugare diferențiată (după M. Bessis, 1966).
Numărul de turații a centrifugelor diferențiate variază între 5 000 și 20 000 pe minut. Astfel se poate obține un număr suficient de mare de organite pentru a fi studiate morfologic și biochimic (24). De la stînga la dreapta: *a.* eritroblești; *b.* aceiași eritroblești după distrugere (broiaj); *c.* produsul de broiaj după o primă centrifugare (care separă nucleii de organitele citoplasmatice); *d.* supernatantul după ultracentrifugare diferențiată (care permite izolarea diferitelor organite celulare în straturi cu densitate crescîndă). *Legenda:* *m*=membrane; *R*=ribozomi; *M*=mitocondrii; *L*=lizozomi.

nite citoplasmatice, studiul sensibilității nucleilor la mediul extern, interacțiunea celule-virus, evaluarea ecologiei structurilor transplantate, microinjecții de indicatori și altele (50) (fig. 7-2).

c. **Citochimia, histochimia și citoenzimologia.** Progresele citologiei celulare se datorează, în mare măsură, traducerii în termeni biochimici a

structurilor microscopice și ultramicroscopice. *Citochimia* este o știință interdisciplinară, la granița dintre biochimie și morfologie; ea se ocupă cu detectarea, localizarea și identificarea unor substanțe chimice dintr-o celulă (glicogen, grăsimi, proteine, enzime, vitamine, substanțe anorganice), prin provocarea anumitor reacții chimice în interiorul acesteia, fără să modifice structura ei. Citochimia se bazează pe tehnici biochimice adaptate pentru citirea microscopică (care iau locul fotometrelor). Pentru obținerea de informații cît mai complexe asupra compoziției chimice a structurilor celulare se folosesc: colorații specifice, dizolvarea unor structuri cu anumiți solvenți sau enzime, micro-incinerări și altele. Prin dezvoltarea acestor tehnici a luat naștere, relativ recent, o nouă disciplină, *histochimia* (chimia țesuturilor) care se ocupă cu studierea localizării și interpretarea prezenței unor substanțe organice în țesuturi. *Citoenzimologia* localizează „in situ", prin metode citochimice, activitatea enzimelor, principiul fiind acțiunea specifică a fiecărei enzime asupra substratului ei. Adaptarea metodelor de microchimie în citochimie și citoenzimologie, au dus la crearea citochimiei cantitative.

Autoradiografia este o metodă citochimică de marcare a moleculelor cu izotopi radioactivi (^{32}P, ^{3}H, ^{59}Fe, ^{55}Fe) și imprimarea imaginilor frotiurilor pe pelicula fotografică; ea a stat la baza unor mari progrese în hematologie (studiul sintezei hemoglobinei, a imunoglobulinelor etc.).

d. **Cultura de celule** sanguine este o metodă care permite studierea celulelor scoase din organism și puse în condiții de viață similare cu mediul lor natural (eventual cu folosirea unor factori de stimulare a creșterii); fragmentul recoltat se numește explant. Tehnicile de cultură sînt numeroase; adesea mediile de cultură sînt formate din plasmă sanguină sau din extracte embrionare; recipientele de cultură diferă și ele.

Introducerea sîngelui uman în astfel de medii întîmpină dificultăți; granulocitele și eritrocitele nu pot fi cultivate și degenerează; produșii de dezintegrare a hemoglobinei au chiar efecte inhibitoare asupra singurelor elemente sanguine cu capacitate de înmulțire, limfocitele. În hematologie, unul din organele mult cercetate prin această tehnică este măduva osoasă. Prin această tehnică s-a putut urmări, între altele și efectul iradierii asupra dezvoltării culturilor.

e. **Izotopii radioactivi.** Izotopii sînt elemente chimice care posedă același număr de ordine în tabelul lui Mendeleev dar se deosebesc între ei prin greutatea (masa) atomică, imprimată de numărul diferit de neutroni din nucleu; numărul de electroni și proprietățile chimice ale izotopilor sînt identice. Izotopii pot fi stabili și radioactivi; cei radioactivi, la rîndul lor, se împart în naturali (radiu, uraniu etc.) și artificiali (mai ușori decît uraniul). Astăzi se folosesc în medicină peste 100 de specii de izotopi, dar cei mai importanți sînt: iod 131, aur 198, crom 51, fier 59, tehneţiu 99 m (metastabil) și cobalt 60. Același element poate să aibă mai multe feluri de radioizotopi, după tipul de radiații emise (α, β, γ), împrejurare de care depind și diferențele în timpul lor de înjumătățire (T 1/2), de la secunde la ani. Prin proprietățile lor de a emana radiații, ei pot servi ca *trasori* ce pot fi urmăriți cu ajutorul *detectoarelor* de radiații în

studierea diferitelor procese biologice. Pentru „ochii“ sensibili ai detectoarelor, ei „strălucesc“ în punctul unde se află, ca o aureolă de radioactivitate permiţînd să se localizeze zonele unde sînt încorporaţi, precum şi urmărirea traseului pe care l-au parcurs în labirintul transformărilor metabolice, încă de la pătrunderea lor în organism. De la inventarea microscopului şi a aparatului Roentgen, trasorii radioactivi au devenit auxiliari importanţi pentru diagnostic. Folosirea radioizotopilor în medicină a deschis un vast cîmp de aplicaţii cu perspective din cele mai promiţătoare (226, 302).

Se perfecţionează continuu şi aparatele detectoare, care devin mai sensibile, mai selective şi cu un grad tot mai mare de automatizare. În prezent poate fi urmărită evoluţia concomitentă a mai multor tipuri de izotopi introduşi simultan în organism. Aceste metode pot atinge un grad extrem de sensibilitate; astfel este suficient ca o singură moleculă, din 10 000 sau chiar din 100 000, să poarte eticheta radioactivităţii ca să fie sesizată de aparatele de detecţie. Din cauza efectelor nocive pe care le-ar putea avea radiaţiile, doza de izotopi administrată trebuie să fie pe cît posibil mai mică. Ele sînt cu atît mai nocive cu cît perioada de înjumătăţire este mai lungă şi puterea lor penetrantă mai mare (raze γ). În general se administrează o doză care reprezintă circa 1/20 din doza de iradiere la o radiografie pulmonară.

Folosirea izotopilor în domeniul patologiei eritrocitare este complexă; prin aceste metode s-a putut realiza, în plus faţă de metodele clasice corespunzătoare, o urmărire dinamică a metabolismelor intermediare la nivel celular sau umoral (în completare vezi şi pag. 349, 356, 433).

B. STRUCTURA CELULARĂ

Celula este forma superioară de organizare a materiei vii; ea este unitatea biologică elementară, alcătuită din nucleu, citoplasmă şi membrană, capabilă să se reproducă singură. Structura celulară este atît de complexă încît poate constitui, singură, organismul unor plante sau animale. Celula este un imens agregat de structuri macromoleculare şi de organite, înzestrate cu funcţii specializate (fig. 1-5). Procesele metabolice ale celulei normale nu au loc la întîmplare, ci într-o ordine precisă; macromoleculele şi organitele constituie o „confederaţie“ strict reglementată Celula nu reprezintă însă o „autarhie“ ci este o unitate integrată într-o vastă cooperare cu alte celule cu care, împreună, realizează organismul viu. Viaţa organismelor este în funcţie de interrelaţiile coordonate ale celulelor şi de reacţiile adecvate ale acestora faţă de mediul lor extern; aceste interdependenţe stau la baza oricărui echilibru biologic (eubioză) (25, 50, 156, 259, 296).

1. MEMBRANA CELULARĂ

Suprafaţa celulară este delimitată de o membrană; ea rezultă din asocierea şi condensarea unor substanţe tensioactive, în primul rînd lipoproteice, formate de zona periferică a citoplasmei (ectoplasma); ea alcătuieşte o barieră selectivă la nivelul căreia au loc schimburi între celulă şi mediul ei înconjurător. Deşi reprezintă o structură limitantă, membrana

Scanned with OKEN Scanner

are și rolul de a integra celula în unitatea funcțională a organismului contribuind la desfășurarea, în condiții specifice, a metabolismului celular pe baza schimburilor permanente de apă, electroliți și metaboliți între celulă și lichidele extracelulare. De asemenea, ea îndeplinește și alte funcții accesorii, ca mobilitate, adezivitate, joncțiuni celulare, reacții imunologice de suprafață, transportul prin membrană etc. (50, 111, 137, 277).

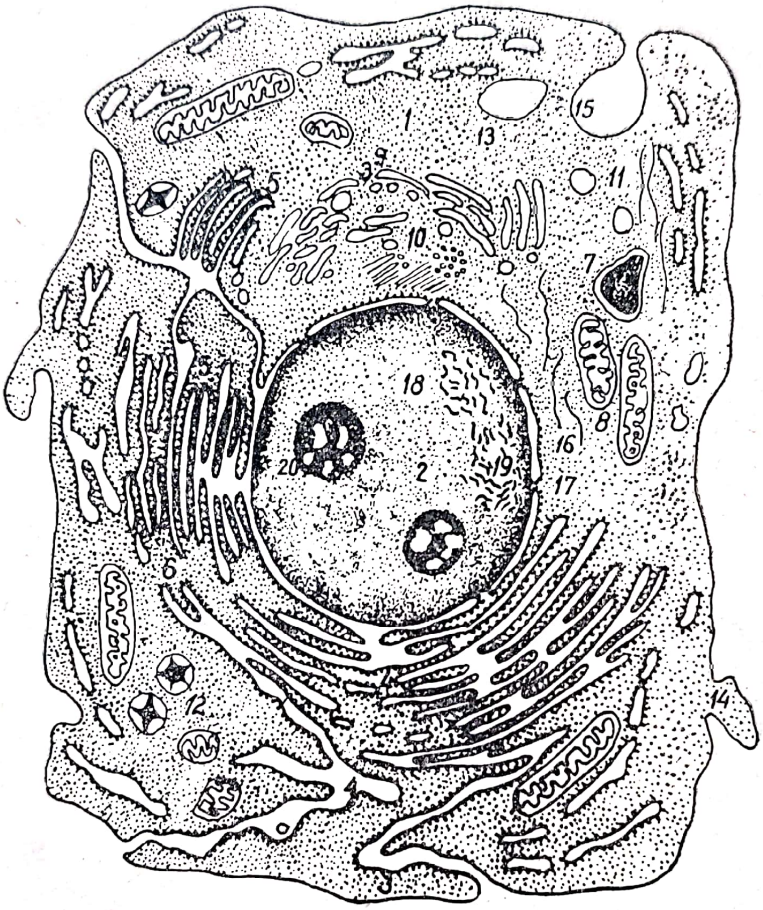


Fig. 1-5. Schema structurii electrono-microscopice a celulei (prototip).

Legenda: 1=substanța (matricea) fundamentală cu ribozomi liberi; 2=nucleu; 3=membrana celulară; 4=reticul endoplasmic; 5=ergastoplasmă; 6=ribozomi atașați de membranele reticulului endoplasmic; 7=lizozomi; 8=mitocondrii; 9=sistem Golgi; 10=centru celular; 11=protofibrile; 12=incluziuni lipidice; 13=vacuolă; 14=microvilozitate; 15=vacuolă pinocitară; 16=membrană nucleară; 17=pori ai membranei nucleare; 18=carioplasma; 19=cromozomi în interfază; 20=nucleoli.

Microscopul optic nu a putut pune în evidență nici un detaliu structural al membranelor. Cu ajutorul microscopului electronic și prin alte metode, a fost posibilă decelarea structurii și a numeroase detalii ale biomembranelor. Grosimea membranei celulare este de aproximativ 10 mu (100 Å).

a. **Structura membranei.** Suprafața celulei nu are un contur fix din cauza permanentelor ondulații, invaginații sau formațiuni poliploide care

Scanned with OKEN Scanner

conferă celulelor vii un contur anfractuos. Aceste aspecte nu sînt însă fixe ci reprezintă morfologia celulară la un moment dat; microcinematografia arată că unele celule libere prezintă mişcări ondulatorii dînd impresia de permanentă agitaţie şi restructurare; zone de membrană dispar şi reapar, delimitînd noi canalicule de comunicare cu celula (81, 137).

Fig. 1-6. Secţiune printr-un reticulocit examinat la microscopul electronic (după M. Bessis, 1966).

Aspectul anfractuos al conturului celulei este provocat de mişcările celulare proprii. De remarcat prezenţa organitelor citoplasmatice (ribozomi, mitocondrii, vacuole de rofeocitoză, resturi ale sistemului Golgi etc.).

Mecanismul de formare şi de retragere a acestor „voaluri ondulante" presupune existenţa unor alternanţe continui ale tensiunii de suprafaţă sub influenţa unor condiţii externe sau interne. Aceste mişcări se întîlnesc, în special la celulele mobile, ca polimorfonuclearele, macrofagele etc., dar se constată şi la eritroblaşti şi chiar la reticulocite (fig. 1-6).

Scanned with OKEN Scanner

Cercetări foarte vechi au stabilit că membrana este de natură lipo-proteică, iar altele mai recente sînt pe cale de a preciza compoziţia şi orientarea straturilor care o alcătuiesc. După modelul propus de Danielli şi Dawson (1935), membranele ar avea o structură trilaminată: un strat mijlociu lipidic, flancat de două straturi proteice (fig. 1-7).

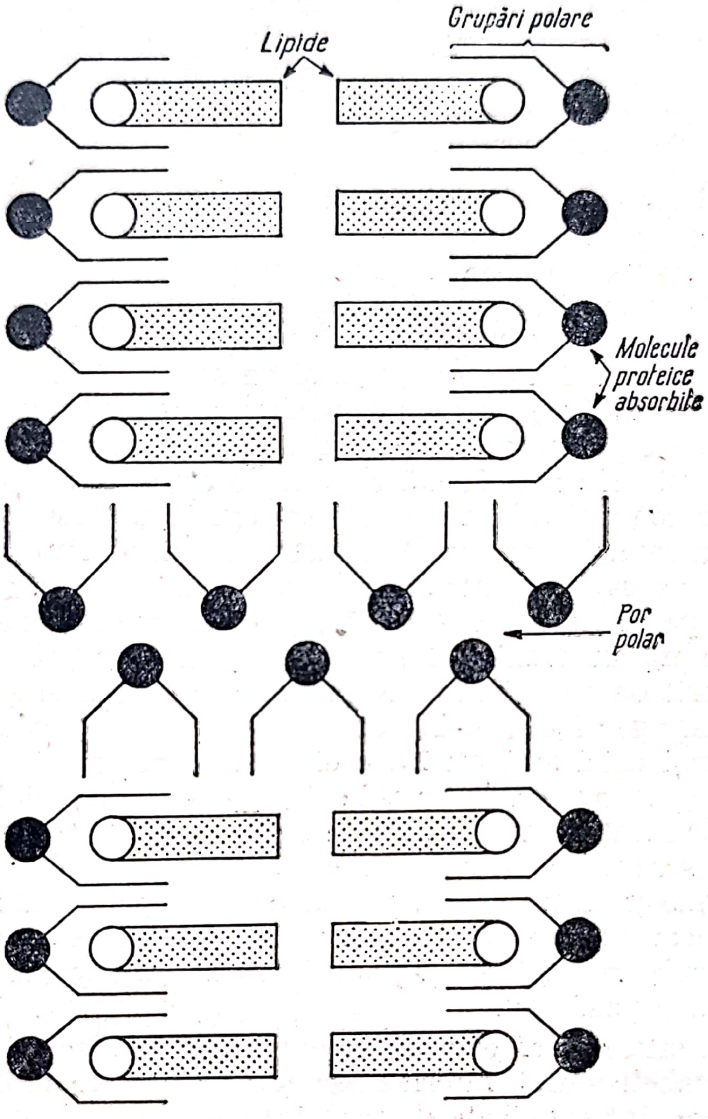


Fig. 1-7. Structura schematică a membranei celulare după modelul sugerat de Danielli şi Dawson (1935).

Membrana nucleară are o structură trilaminată: un strat lipidic median bimolecular, flancat în interior şi exterior de două straturi proteice. Grupele nepolare ale lipidelor stau faţă în faţă, în timp ce grupele polare, opuse, interacţionează cu grupele nepolare proteice. Se presupune existenţa „porilor" sau „canalelor de apă" (cu existenţă trecătoare), formate prin interacţiuni hidrofobe, care ar traversa membrana perpendicular.

Conform părerii emise de Robertson, ar exista o unitate universală a structurilor celulare care posedă membrane: conturul celular propriu-zis, nucleul, reticulul endoplasmatic, mitocondriile etc. Totuşi, chiar dacă aranjamentul bimolecular în strat continuu propus de Danielli şi Dawson ar reprezenta baza structurală a membranelor, se pare că există numeroase abateri de la această structură, atît

Scanned with OKEN Scanner

pe porţiuni de membrană, dar mai ales la nivelul organitelor citoplasmatice (92). O formă structurală care a fost mult studiată, este membrana eritrocitară (vezi şi cap. 3, pag. 165).

Porii membranelor. Înainte de a se fi cunoscut modalitatea transportului activ prin membrană prin intermediul enzimelor, s-a crezut că schimburile s-ar efectua prin intermediul unor pori, care ar avea rolul unor „hublouri" supuse controlului unor factori diverşi (gradient de concentraţie electrolitică, enzime, hormoni etc.). „Craterele" de diferite dimensiuni, descrise de numeroşi autori în primii ani ai observaţiilor electrono-microscopice, s-au dovedit a fi, atît aspecte ale „faldurilor" membranei în permanentă mişcare în cursul hrănirii prin pinocitoză, cît şi leziuni structurale ale membranei.

b. **Permeabilitatea şi funcţia de transport** a membranei eritrocitare sînt mecanisme ale metabolismului celular. Membrana eritrocitară se comportă, într-un fel, ca o membrană semipermeabilă; permeabilitatea şi capacitatea ei de transport sînt supuse, în primul rînd, legilor difuziunii şi osmozei; acestea, la rîndul lor, sînt condiţionate de gradientul electrochimic al membranei. Cînd de o parte şi de alta a unei membrane există o concentraţie diferită de substanţe dizolvate, se produce un flux molecular din partea cu concentraţie mare spre partea cu concentraţie mai mică. Transportul prin membrană este *pasiv* cînd se desfăşoară în sensul gradientului de concentraţie, tinzînd către egalizarea concentraţiilor celor două compartimente. Pentru unele substanţe transportul prin membrane se desfăşoară invers, în contra gradientului de concentraţie (transport în amont), iar pentru altele se aplică bariere suplimentare de difuziune. Acest fenomen numit *transport activ* sau *difuziune favorizată* necesită un consum sporit de energie. În aceste cazuri membrana eritrocitară este capabilă să „distingă" ionul de K^+ de cel de Na^+, D-glucoza de L-glucoza, precum şi diverşi acizi aminaţi între ei (24). În acest sens trebuie amintite diferenţele dintre concentraţiile intra- şi extracelulare ale unor electroliţi: concentraţii intracelulare crescute de K^+, Mg^{++}, Ca^{++}, fosfat şi concentraţii scăzute de Na^+, Cl^-, bicarbonat intracelular. Sursa principală de energie pentru această formă de transport o constituie omnipotentul ATP, care, sub acţiunea ATP-azei (enzimă ce intră în compoziţia însăşi a membranei celulare), pune în libertate energia depozitată (în completare vezi şi pag. 220).

Membrana eritrocitară este un conglomerat de „locuri" pentru unele reacţii ale metabolismului intermediar şi biosintezele moleculare. Cum aceste biosinteze sînt catalizate de proteine, rolul principal în transportul activ îl au reacţiile enzimatice la care se adaugă celelalte componente ale membranei. Dintre acestea lipidele au un rol primordial; aranjamentul lor în structura membranelor este determinat de activitatea proteinelor. Acest aranjament permite oprirea penetrării în celulă a substanţelor pentru care nu există un mecanism de transport activ. Combinaţiile lipoproteice interacţionează în transportul activ prin membrană; o transformare alosterică a proteinelor este suficientă să schimbe legătura unei substanţe dintr-o soluţie de pe o parte pe alta a membranei.

Transportul moleculelor neutre, ca zaharurile, se face după legile difuziunii diferenţiate. Aici se presupune, fie o „difuziune favorizată" cu molecule purtătoare care fac posibil transportul prin mediile lipofile

Scanned with OKEN Scanner

ale membranei, fie o penetrație printr-un număr limitat de pori hidrofili ai membranei (intervenind și aici o anumită specificitate chimică). O difuziune simplă a glucozei prin membrană este exclusă; ea nu poate traversa membrana sub forma de glucoză-fosfat căci fosforilările au loc în mediul intern al eritrocitului; penetrarea glucozei în eritrocit este independentă de insulină. În contrast cu permeabilitatea ușoară a monozaharidelor, pentru dizaharide există o impermeabilitate aproape totală. Acizii aminați pătrund în eritrocit tot printr-un transport favorizat, cu ajutorul unor „cărăuși" specifici. Nucleotidele nu pot pătrunde prin membrana eritrocitară; spre deosebire de nucleotide, nucleozidele și bazele azotate purinice pot străbate membrana, iar în interiorul eritrocitului se completează sinteza lor pînă la nucleotid (121).

c. **Funcțiile de înglobare ale membranei celulare.** După mărimea particulelor incluse, funcțiile de înglobare celulară sînt: *fagocitoza, pinocitoza* și *rofeocitoza**. Aceste trei funcții celulare constituie manifestări vizibile ale nutriției celulare prin care se captează particule ce nu pot difuza direct prin membrana celulară. Procesele celulare de înglobare reprezintă un fenomen general, comun pentru foarte multe tipuri de celule.

1) *Fagocitoza* reprezintă încorporarea în celulă a unor elemente corpusculare de dimensiuni mari, după care urmează descompunerea lor. Zoologul rus Mecinikov, care a lucrat cu Pasteur la Paris (1883), a fost primul care a văzut la microscopul optic și a știut să interpreteze acest fenomen. El l-a descris la protozoare ca pe un proces de hrănire iar la vertebrate, ca pe un mijloc de apărare (în completare vezi și cap. 7, pag. 374).

2) *Pinocitoza sau microfagocitoza* reprezintă pătrunderea în celulă, prin invaginație, a unor particule de dimensiuni mici, care sînt apoi încorporate în citoplasmă. Acest fenomen mult mai răspîndit decît fagocitoza, a fost văzut la microscopul optic cu decenii în urmă. Pinocitoza este foarte asemănătoare cu fagocitoza, cu deosebire că particulele înglobate sînt mult mai mici și sînt reprezentate prin picături de lichid.

3) *Rofeocitoza sau micropinocitoza* reprezintă aproximativ același fenomen ca pinocitoza, dar la o scară de circa 500 de ori mai redusă (particulele sînt de maximum cîteva sute de Å); ea poate fi observată numai la microscopul electronic. Rofeocitoza poate fi văzută frecvent la eritroblești, cu ocazia înglobării moleculelor de feritină (vezi și fig. 6-6).

În timp ce fagocitoza este o proprietate a unor celule specializate, pinocitoza și rofeocitoza sînt proprii tuturor celulelor.

2. CITOPLASMA

Citoplasma este substanța organică cuprinsă între membrană și nucleu; ea conține o substanță fundamentală neomogenă în care sînt incluse numeroase formațiuni microscopice denumite organite citoplasmatice sau celulare (fig. 1-8).

---

* Acești termeni provin de la cuvintele grecești, *phagein*=a mînca, *pinein*=a bea și *rhofein*=a absorbi.

Scanned with OKEN Scanner

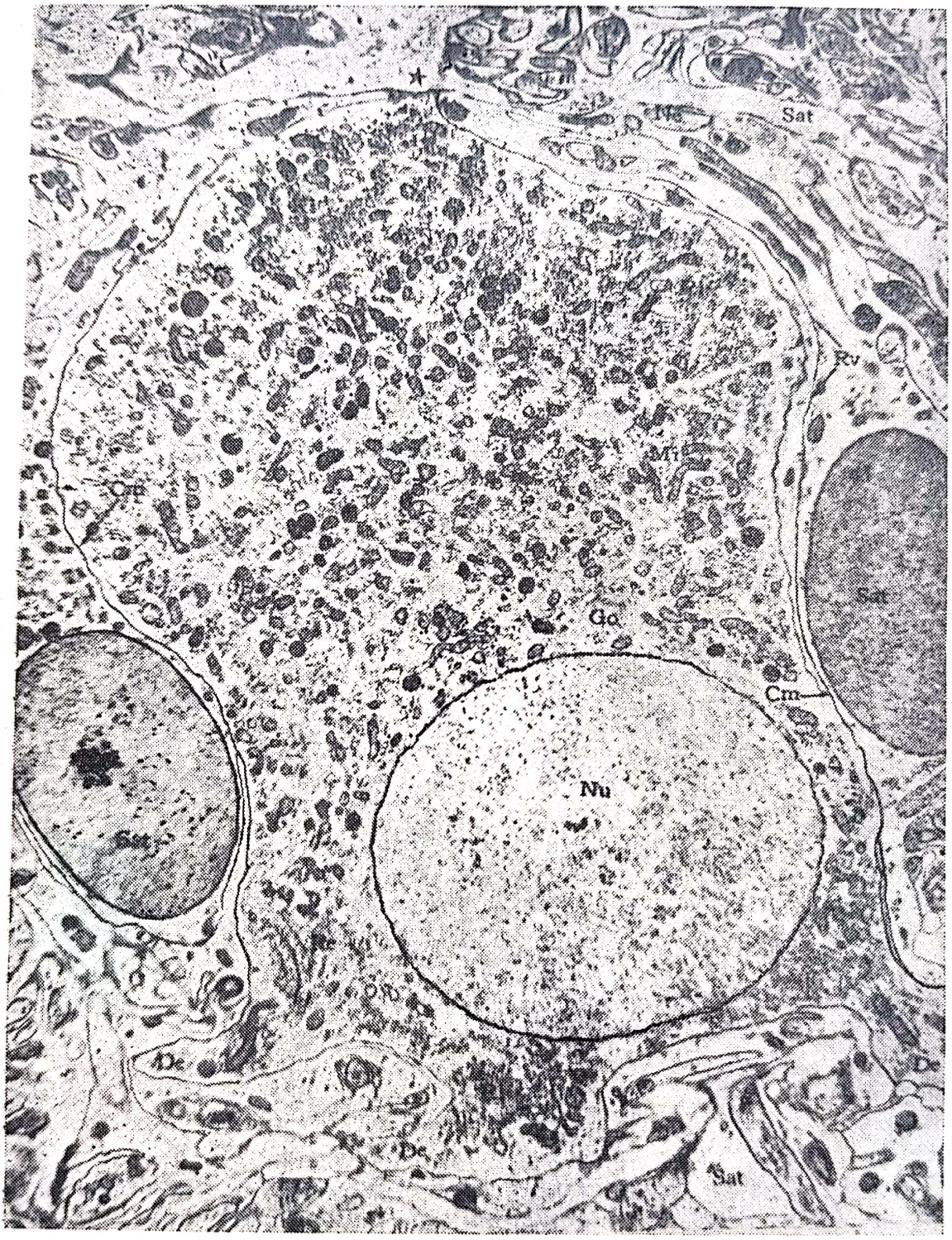


Fig. 1-8. Aspect electromicroscopic al unei celule complete, înconjurate de alte fragmente celulare din acelaşi ţesut.

De remarcat caracterul heterogen al citoplasmei în care organitele sînt dispersate în substanţa fundamentală.

Scanned with OKEN Scanner

a. **Organitele citoplasmatice.** Fiecare celulă conţine un număr variabil de organite care au rolul de a-i asigura, alături de nucleu, de membrană şi de substanţa fundamentală citoplasmatică, metabolismul, înmulţirea, maturarea, mişcările, precum şi alte funcţii. Aceste organite nu sînt structuri izolate, ci fac parte dintr-un sistem coordonat. Unele organite au fost observate încă de la începuturile microscopiei optice, dar abia tehnicile moderne au permis studierea detaliilor şi înţelegerea multora din funcţiile lor. Ele au putut fi astăzi izolate şi supuse analizelor cantitative chimice şi biochimice.

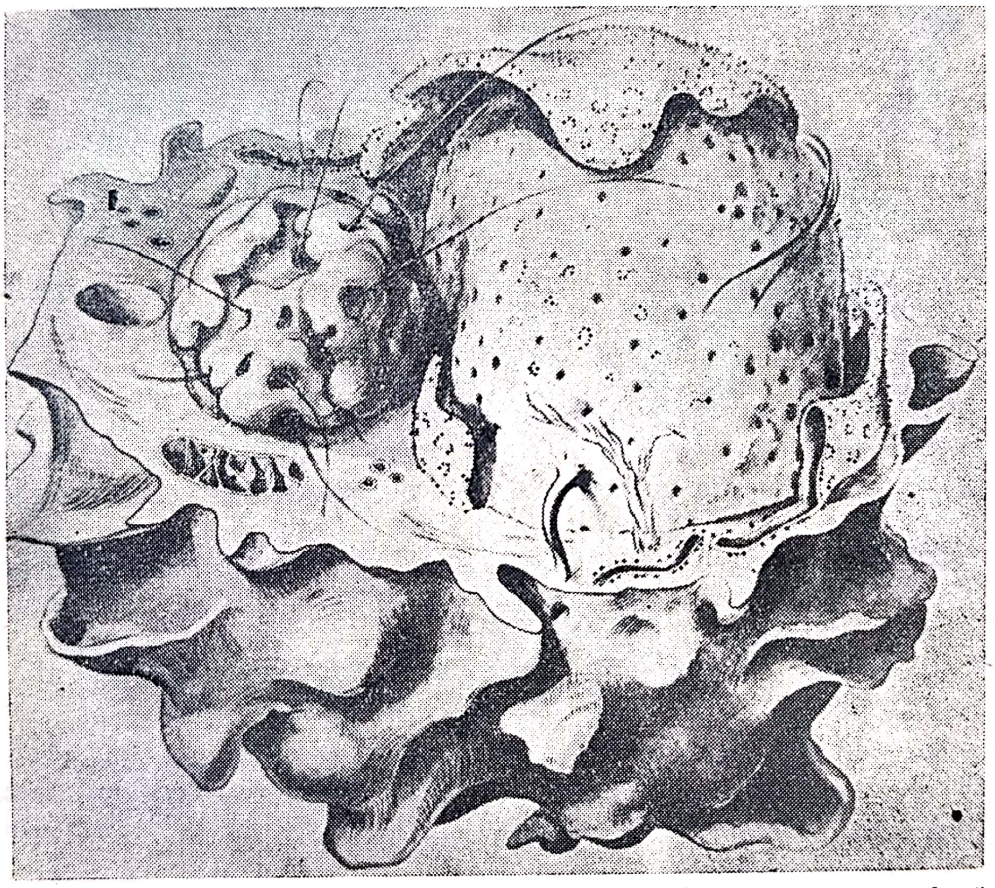


Fig. 1-9. Model de celulă sanguină înfăţişată tridimensional (după M. Bessis, 1972).

Sistemul Golgi este reprezentat sub forma unei „sfere găunoase" în interiorul căreia se ascund centriolii din care pleacă microtubulii, asemenea unor „antene de sateliţi". În dreapta este reprezentat nucleul cu porii nucleari; membrana externă a nucleului se prelungeşte cu un canal de reticul endoplasmic, care comunică cu exteriorul. În jurul nucleului sînt reprezentate, de asemenea, porţiuni de reticul endoplasmic rugos. Se mai remarcă o secţiune longitudinală printr-o mitocondrie şi alte cîteva organite neidentificate.

Sistemul canalicular şi vacuolar al citoplasmei. Microtubulii sînt organite lamelare ce participă direct sau indirect la procesele celulare fundamentale. Din acest sistem fac parte, în primul rînd, reticulul endoplasmic şi sistemul Golgi (16, 92, 137).

1) *Reticulul endoplasmic* formează o vastă reţea de canale care şerpuiesc în toate direcţiile în interiorul citoplasmei legînd compo-

Scanned with OKEN Scanner

nentele celulare cu nucleul, iar pe toate împreună cu mediul ambiant; singure eritrocitele sînt lipsite de acest sistem. Reticulul endoplasmic se observă numai la microscopul electronic, unde apare sub formă de fragmente tubulare, vezicule și cisterne cu lungimi și grosimi variabile. Pe baza aspectelor diferite ale reticulului endoplasmic, în funcție de prezența sau absența ribozomilor marginali, acest sistem a fost împărțit în neted și rugos. Rețeaua granulară este cu atît mai bogată, cu cît activitatea secretorie a celulei este mai intensă (de exemplu, la plasmocit). Eritroblaștii, a căror activitate secretorie extracelulară este practic absentă, au un reticul endoplasmic relativ redus.

2) *Sistemul Golgi* este de asemenea prezent în toate celulele; el a fost descris de Camillio Golgi în 1898 sub forma unei rețele perinucleare; acesta reprezintă o formă diferențiată a reticulului endoplasmic. Termenii de aparat sau corpusculi Golgi sînt improprii, fiind de preferat termenii de sistem, rețea sau complex Golgi. La microscopul electronic sistemul apare format din saci membranoși și din tuburi fine aplatizate sau dispuse în stive, precum și din vezicule mici și dense (de 0,05—0,1 μ) sau mari și rare (de 0,5—3 μ). Acest aspect morfologic variat reprezintă un sistem canalicular agranular. Sistemul Golgi este localizat în apropierea nucleului, în conjurînd de obicei unul din polii acestuia (fig. 1-9). Este bine dezvoltat la majoritatea celulelor secretoare, dar este practic absent sau rudimentar în celulele epiteliilor stratificate sau scuamoase. Se atribuie acestui sistem un rol de selecție, transport și condensare a proteinelor sintetizate de ribozomi. În timpul diviziunii mitotice, sistemul Golgi se împarte între cele două celule fiice.

3) *Mitocondriile* sînt formațiuni citoplasmatice prezente în toate celulele animale și vegetale, cu excepția eritrocitelor. Dimensiunile lor sînt foarte variabile (lungimea de la 0,5 μ sau chiar mai puțin, pînă la 6 μ, iar grosimea — între 0,3 și 2 μ), încît unele mitocondrii pot fi văzute chiar și la microscopul optic sub formă de granule ovalare.

Cu ajutorul microscopului electronic s-au putut observa numeroase detalii din structura tridimensională a mitocondriilor (fig. 1-10). Aspectul lor este asemănător la diferite tipuri de celule; forma este ovoidă, uneori ușor biconcavă, alte ori reniformă, dar totdeauna cu marginile rotunjite; în unele cazuri pot lua forme bizare, ca rachetă, măciucă etc. Aceste descrieri corespund însă unei stări statice; în realitate mitocondriile sînt organite cu o mare plasticitate și în permanentă mișcare, totodată antrenate de curenții citoplasmatici. Urmărite în timp, se pot observa mitocondrii care se fragmentează; fragmentele se pot suda, fie între ele, fie unele cu altele, așa încît volumul unor mitocondrii poate crește foarte mult; alteori mitocondriile se pot „topi" în citoplasmă, sau contopi cu alte organite.

Numărul mitocondriilor este, de asemenea, variabil; celulele tinere, mai ales cele secretorii în plină activitate, conțin un număr mai mare de mitocondrii decît cele adulte; astfel, în proeritroblaști apar 20—30 astfel de organite vizibile pe celulă, pe cînd în reticulocite numărul lor este redus. În realitate numărul mitocondriilor este mult mai mare; un singur hepatocit poate conține cîteva mii de mitocondrii. Numărul lor este, după cum s-a mai spus, proporțional cu intensitatea proceselor metabolice ale celulei (180, 185).

Originea mitocondriilor rămîne obscură, este mult discutată ipoteza că mitocondriile ar putea proveni dintr-o celulă procariotă („protomitocondrie") care ar fi fost înglobată în citoplasma unei structuri anaerobe din care a rezultat o simbioză utilă în condițiile prezenței oxigenului (121, 137, 227).

Scanned with OKEN Scanner

Funcțiile mitocondriale sînt legate, în principal, de procesul respirației celulare și de acumularea energiei rezultate din diferite procese oxidative sub formă de ATP. Prin aceasta mitocondriile au rolul unor „uzine" care își însușesc energia conținută în anumite substanțe organice, o depozitează și o furnizează apoi celulei, pentru a fi utilizată în diferite

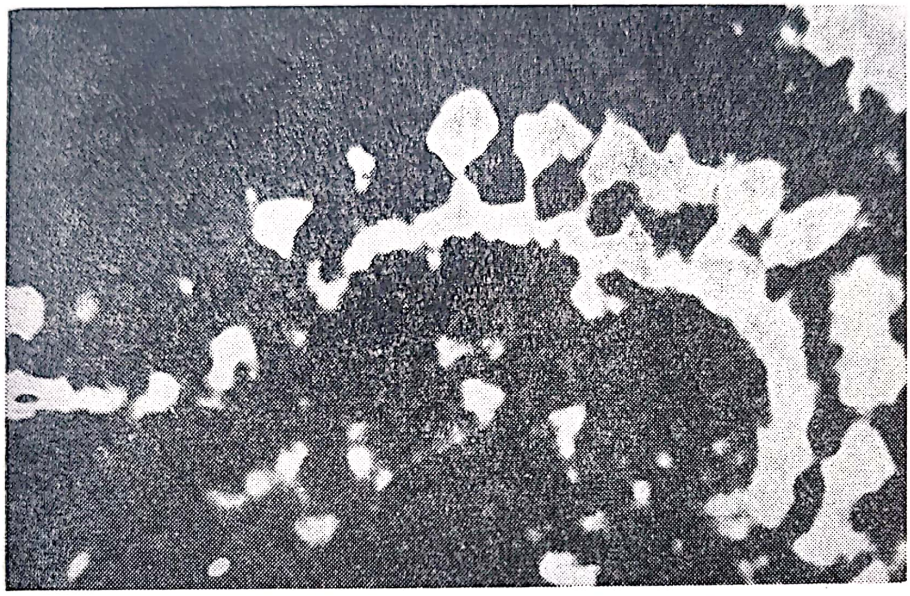


Fig. 1-10. Segment detaliat de creastă mitocondrială (după A. Gajdos, 1967).

Se remarcă cele trei particule elementare, capul, tija și baza, precum și legătura dintre șirul de capete și stratul dens subiacent al crestei (cristei), care împarte cavitatea mitocondrială în loji. (Microscopie electronică, mărire de 600 000 ×).

procese metabolice. Prin conținutul bogat în enzime, mitocondriile au un rol hotărîtor în economia celulară; ele sînt sediul a numeroase sinteze și intervin în fenomenele de absorbție și secreție. Datorită poziției „cheie" pe care mitocondriile o dețin în metabolismul celular, o tulburare în funcțiile acestora duce la leziuni histologice cu consecințe funcționale. Este cunoscut aspectul caracteristic al sideroblaștilor, cu agregate de fier dispuse în „coroană perinucleară" în anemiile hipocrome hipersideremice (anemie sideroacrestică, talasemie și altele), cu ștergerea structurii lor, prin aglomerare de feritină și hemosiderină (vezi și fig. 6-10).

4) *Lizozomii* sînt formațiuni citoplasmatice rotunde, delimitate de membrane lipoproteice, cu conținut bogat în enzime hidrolitice foarte puternice, aflate în stare inactivă. Dimensiunile lizozomilor sînt aproximativ egale cu cele ale mitocondriilor. Cu excepția eritrocitelor, ei au fost observați la toate celulele. În majoritatea cazurilor lizozomii sînt situați în zona aparatului Golgi, din care se presupune că ar deriva; tot de aici ar proveni și enzimele pe care le conțin (21, 93, 117).

Toate celulele au capacitatea de a încorpora particule străine și de a le prelucra litic în interiorul unor vacuole celulare; acest fenomen se realizează prin activizarea enzimelor din lizozomi, după ce vacuolele de

Scanned with OKEN Scanner

înglobare au fuzionat cu lizozomii. Enzimele lizozomiale sînt capabile să degradeze toţi constituenţii principali ai materiei vii (corpi microbieni, deşeuri ale metabolismului celular etc.).

De exemplu, osteoclaştii, în acţiunea lor de „erodare" a osului, acţiunea spermatozoidului în permeaţia ovulului, acţiunea litică a granulaţiilor polinuclearelor etc. sînt activităţi lizozomiale. În cursul activităţii heterofagice a polinuclearelor se observă un fenomen de degranulare leucocitară prin vărsarea conţinutului granulaţiilor în fagozomi şi apariţia de vacuole digestive intraleucocitare (186). Heteroliza lizozomială se produce în 3 etape (fig. 1-11).

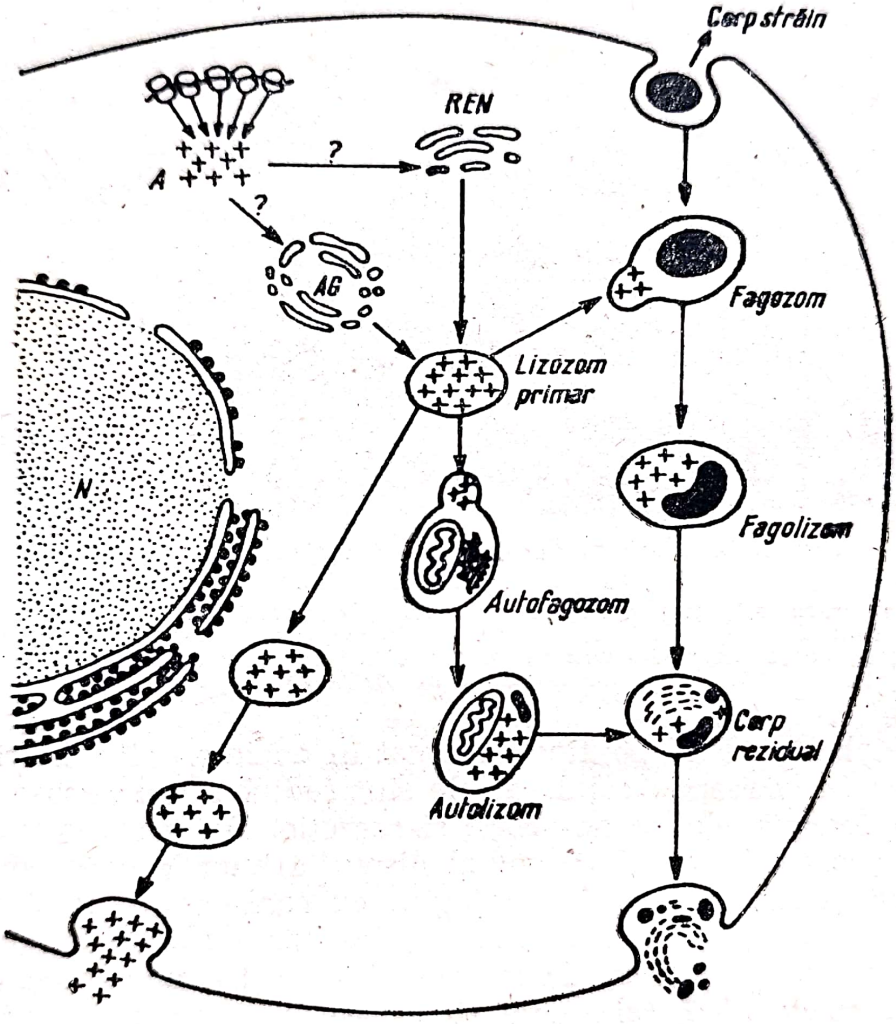


Fig. 1-11. Reprezentare schematică a formării lizozomilor primari şi secundari (după I. Diculescu şi colab., 1970)

Etapele de hidroliză lizozomială sînt următoarele: *ingestia* (înglobarea) materialului într-o veziculă formată dintr-o invaginaţie a membranei care izolează corpul fagocitat de citoplasmă (fagozom primar); *digestia* propriu-zisă, cînd lizozomii atraşi prin tactism de către fagozomii primari fuzionează cu aceştia; enzimele lizozomiale atacă materialul fagocitat pe care îl digeră; un eritrocit este digerat de către celula macrofagă în circa 60 de minute; *exgestia* în care vacuola, cu conţinutul de digestie, este eliminată din celulă; alteori, după o anumită etapă de digestie, pot rămîne corpi reziduali nedigerabili de natură diferită (depozite de fier sub formă de feritină etc.) (92, 93). *Legendă:* A=enzime lizozomiale ce se îndreaptă de la locul de sinteză (ribozomi) spre un sistem canalicular. REN=reticul endoplasmatic neted; AG=aparat Golgi; L.P.=lizozom primar; A.F.=autofagozomi; A=autolizom; F=fagozom; FL=fagolizom; C.R.=corp rezidual.

Scanned with OKEN Scanner

Echipamentul enzimatic al lizozomilor este heterogen; el variază în raport cu specia, cu tipul de celulă, cu ciclul vital al lizozomilor etc. Pînă în prezent au fost descrise peste 15 enzime lizozomiale din categoria hidrolazelor (68, 81).

Pentru menţinerea structurii lor, lizozomii necesită de asemenea energie, pe care o primesc de la moleculele de ATP. În caz de scădere a ATP, ca în stările de inaniţie, se pun în libertate, prin autofagie, substanţe provenite din constituenţii celulari (necroză parţială, din ai cărei produşi se recuperează energia necesară). Atîta timp cît integritatea structurală a membranei lizozomiale este păstrată, enzimele sînt izolate de restul citoplasmei şi menţinute în stare inactivă în interiorul lizozomilor (deci neagresive pentru celulă). Anumite substanţe pot deveni nocive pentru lizozomi atacîndu-i din interior; astfel, porfirinele sintetizate în exces sînt captate de lizozomii din celulele pielii şi, sub acţiunea razelor ultraviolete, se poate produce dezintegrarea lor, eliberînd histamine, plasmine, polipeptide, ca şi unele enzime, ceea ce explică leziunile caracteristice (leziuni inflamatorii, necroză parţială).

Bolile prin deficit de enzime lizozomiale nu sînt mai puţin grave decît cele prin exces de secreţie. În caz de absenţă a unor enzime, metaboliţii nu pot fi degradaţi mai departe, ceea ce duce la tezaurizarea lor.

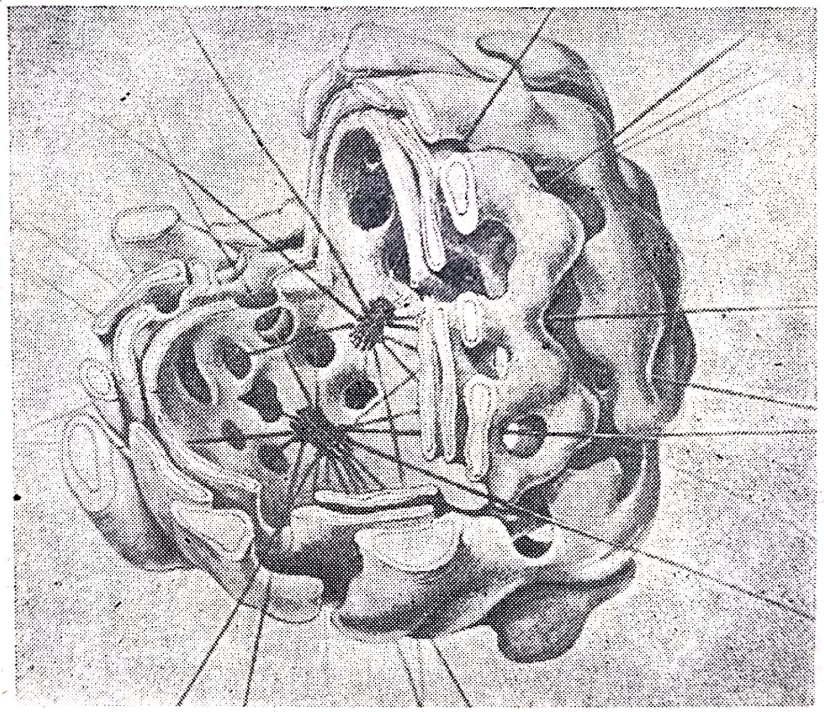


Fig. 1-12. Model tridimensional al centrozomului într-o celulă sanguină (după M. Bessis, 1973).

În celulele sanguine, în interfază, centriolii sînt plasaţi în centrul complexului Golgi cu care formează centrozomul. Din microtubulii centriolului se desprind prelungirile caracteristice.

5) *Centrul celular* este un complex morfologic cu aspect variabil după stadiul funcţional al celulei, mai greu vizibil în interkineză şi foarte evident în cursul diviziunii celulare (mai ales în meta- şi anafază) (fig. 1-12). Funcţia centriolului este legată de procesul de diviziune celulară. În faza intermitotică are, de obicei, o poziţie relativ fixă, în apropierea nucleului, pe cînd în mitoză are o mare mobilitate; deplasarea lui precede migrarea cromozomilor (248).

Scanned with OKEN Scanner

În cursul mitozei microtubulii centriolului formează un fus de fibre care au rol de a tracționa cromozomii spre cei doi poli. În cursul telofazei microtubul continuă să mai țină un timp legate cele două celule fiice prin aceste filamente citoplasmatice, care pot fi uneori foarte lungi, fenomen frecvent observat pe frotiurile de măduvă osoasă la eritroblești. Există și ipoteza că microtubulii formează un gen de schelet care menține forma celulei (4) (vezi și fig. 1-16).

Funcția centriolului este legată de procesul de diviziune celulară. Prin microcinematografiere în contrast de fază s-a observat cum centrul celular devine centrul kinetic al celulei, coordonînd mișcările cromozomilor spre cei doi poli, prin intermediul fibrelor continue ale fusului acromatic care ar conține o substanță proteică contractilă.

6) *Ribozomii* (vezi pag. 56).

b. **Substanța citoplasmatică fundamentală.** Sub această denumire se înțelege partea de citoplasmă mai puțin structurată, foarte puțin diferențiată morfologic, în care își desfășoară activitatea organitele celulare. Densitatea ei este mai redusă, iar aspectul variază după diferitele zone ale celulei, mai clară la periferie (hialomer) și neomogenă în zonele centrale. În interiorul matricei citoplasmatice ar putea să existe și alte organite asemănătoare cu cele descrise mai sus dar ale căror funcții nu au putut fi legate de structuri.

În substanța fundamentală sînt incluse multiple substanțe organice și anorganice necesare vieții celulare. Aici se desfășoară o mare parte din procesele metabolice esențiale ale celulei, în care intervine un număr mare de enzime, care reprezintă, cantitativ, o parte însemnată din substanța fundamentală. Tot în matricea citoplasmatică se află depozitate numeroase rezerve metabolice (glicogen, lipide emulsionate, macromolecule diverse), precum și ioni anorganici, săruri, gaze dizolvate și, bineînțeles, apă.

Între substanța fundamentală, aparent fără structură la microscopul electronic, și formațiile citoplasmatice specializate (organite), există o strînsă interdependență funcțională. La microscopul cu contrast de fază s-a pus în evidență o permanentă mișcare în acest sistem coloidal heterogen; curenții interni au direcții și viteze variabile, determinate de procesele metabolice ale celulei.

3. NUCLEUL ȘI ÎNMULȚIREA CELULARĂ

Nucleul este sediul materialului genetic. Prezența nucleului este generală în celulele tuturor viețuitoarelor, cu excepția eritrocitelor și a trombocitelor. Locul nucleului în celulă nu este fix; în afara mișcărilor de deplasare, el prezintă și mișcări de rotație. Unele ființe rudimentare ca *procariotele* (bacterii, alge) au materialul nuclear dispersat în toată masa celulară; el este format dintr-o singură moleculă de ADN, dispusă după o structură cromozomică, iar în lipsa aparatului mitotic, diviziunea se face prin sciziparitate (6).

Scanned with OKEN Scanner

a. **Structura nucleară.** Componentele principale ale nucleului la *eucariote* (ființe complexe) sînt membrana nucleară, nucleolul și carioplasma.

1) *Membrana nucleară* este formată din două foițe cu o grosime de 60—100 Å, cu structură trilaminată. Foița internă este aderentă

Fig. 1-13. Suprafața nucleului unui eritroblast văzută după criodecapaj (după E. Keyahani și M. Bessis, 1969).

Fractura (după înghețare (criodecapajul) nu s-a produs prin mijlocul nucleului, ci a denudat suprafața nucleară; aceasta este presărată cu pori nucleari, în totalitate 200—300, distribuiți neregulat. (Mărire × 15 800).

de masa nucleară, iar foița externă comunică cu membranele reticulului endoplasmic. Foițele nu prezintă un înveliș continuu, ci sînt întrerupte de orificii cu diametrul între 300 și 1 000 Å, numite *pori nucleari*. Ei par să controleze tranzitul materialului biologic dintre nucleu și citoplasmă; ei nu alcătuiesc simple orificii ce perforează membrana nucleară, ci au o

Scanned with OKEN Scanner

structură complicată, diferită de a celorlalte membrane (fig. 1-13). Rolul lor este complex şi numai în parte cunoscut.

2) *Nucleolul* este o componentă nucleară ce devine vizibilă în faza intermitotică. În celulele sanguine nucleolii apar, la colorația panoptică, în număr de 1—3, sub formă de formațiuni rotunde sau ovalare cu contur bine delimitat. Nucleolul nu are membrană, el se află în contact direct cu cromozomii şi cu sucul nuclear. Prin metode moderne de observație s-au pus în evidență numeroase detalii morfologice şi structurale. Nucleolul reprezintă cea mai densă structură a celulei (70—90% substanță uscată). Substanța uscată a nucleului este constituită, în cea mai mare parte, din proteine (80—90%), cantități apreciabile de ARN şi urme de ADN.

Semnificația funcțională a nucleolilor este încă în parte obscură. Ei nu pot fi considerați la fel cu celelalte organite celulare (ribozomi, mitocondrii) care au rol productiv, ci reprezintă, mai degrabă, structuri la nivelul cărora materiale de diferite origini s-ar grupa sau s-ar modifica înainte de utilizare; ei ar fi astfel, mai mult un „oficiu de repartizare", decît un „atelier de fabricare". În acest sens nucleolii, cu conținutul lor ridicat de ARN mesager în tranzit, ar fi nişte intermediari între cromozomi şi citoplasmă. Nu este exclus ca nucleolii să fie produsul unor zone cromozomiale distincte, numite organizatori nucleari (245, 251, 259).

3) *Carioplasma* (cariolimfa, nucleoplasma sau sucul nuclear) este materialul biologic de fond din interiorul nucleului, inclusiv al nucleolului. Examinat, atît cu mijloace clasice, cît şi prin tehnici speciale, aspectul nucleului apare omogen, monomorf, fără detalii esențiale de structură. În nucleu nu există aparat enzimatic de degradare oxidativă; pentru funcțiile sale specifice, nucleul nu necesită prezența oxigenului.

4) *Materialul nuclear* este format în afară de carioplasmă, din *cromatina nucleară*, care variază ca aspect de la un tip de celulă la altul. Ea se reprezintă sub două forme: *granulații fine*, în care cromatina este formată din particule slab colorate şi *grămezi dense* (heterocromatină), intens colorate, dispuse uneori în benzi radiare (aspect de spiță de roată). Cantitatea de material condensat în nucleii aflați în interkinază variază după tipul şi vîrsta celulei. În general, prezența heterocromatinei este o regulă generală pentru celulele evoluate, excepție fac limfocitele (care conțin pînă la 80% heterocromatină), plasmocitele (care sînt celule intens secretorii), precum şi alte celule pentru care prezența nucleului grunjos trebuie să primească o altă explicație. Forma de agregare (laxă sau în structuri compacte) corespunde celor două funcții ale nucleului: metabolică şi genetică.

b. **Diviziunea celulară.** Creşterea, diferențierea şi reproducerea viețuitoarelor se efectuează pe baza procesului de diviziune celulară, prin care se realizează şi transmiterea ereditară a caracterelor de la o celulă la alta şi de la o generație la alta (313).

Scanned with OKEN Scanner

Înmulţirea celulelor este directă (amitotică sau akinetică) şi indirectă (mitotică sau kinetică, cariokinetică)*. Diviziunea directă constă într-o împărţire a citoplasmei şi nucleului prin alungirea şi strangularea acestora. Ea este forma primară de înmulţire a organismelor monocelulare, fiind rar întîlnită la organismele pluricelulare.

La organismele sexuate, diviziunea celulară are două forme: *mitoza*, forma de înmulţire pentru celulele somatice şi *meioza* forma de înmulţire pentru celulele gonadice.

1) *Mitoza* reprezintă forma superioară de diviziune celulară, proprie organismelor mai evoluate. Ea este un proces biologic complex care realizează împărţirea materialului celular (duplicat în copii identice) între cele două celule fiice; fiecare din ele primeşte informaţia genetică integrală a celulei din care provin. Materialul genetic din stadiul de zigot se găseşte distribuit, în stadiul de adult, în tot atîtea copii cîte celule există, indiferent de funcţia pe care o îndeplinesc.

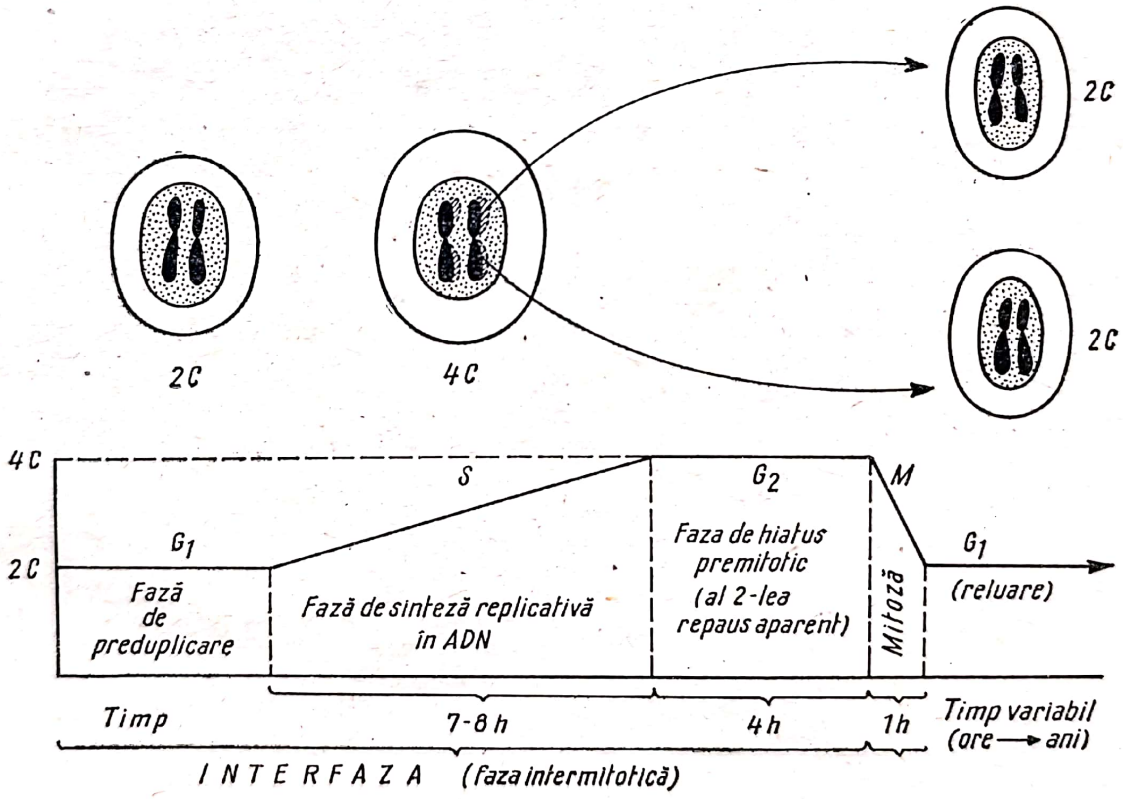


Fig. 1-14. Reprezentare schematică a ciclului mitotic.
Materialul genetic se automultiplică în părţi egale pentru cele două celule fiice cărora le asigură zestrea ereditară a celulei mame. Cantitatea de ADN pe celulă la o anumită specie este constantă, în timp ce cantitatea de ARN şi de proteine variază în limite largi. În stadiul S cantitatea de ADN creşte pînă atinge dublul (stadiu de G_2 sau repaus premitotic), astfel că celulele fiice diploide au exact aceeaşi cantitate de ADN ca toate celulele speciei respective. Cromatidele nou — sintetizate (în faza S) sînt cromatide complementare, care se separă longitudinal în cursul mitozei, astfel că fiecare cromozom în cursul mitozei rămîne cu structura intactă putînd servi, în continuare, ca model (matrice) pentru mitozele următoare şi mai departe din generaţie în generaţie.

* De la cuvintele greceşti: *karyon*=sîmbure, nucleu; *kinein*=a mişca; *mitos*=fir. Termenul de diviziune indirectă provine de la împărţirea nucleului ce precede împărţirea citoplasmei.

Diviziunea mitotică parcurge mai multe etape ale unui ciclu care cuprinde două stadii: unul premergător mitozei, faza intermitotică și altul de diviziune propriu-zisă.

a) *Interfaza* (faza intermitotică sau faza preparativă) reprezintă intervalul dintre două diviziuni, timp în care se petrec procesele metabolice cele mai active, necesare pentru duplicarea (copierea) materialului genetic, în vederea repartizării lui uniforme în cele două celule fiice. În această fază preparativele diviziunii constau într-o sinteză intensă de acizi nucleici, dublarea cantității de ADN față de etapa precedentă, iar în citoplasmă, în înmulțirea numărului de organite și creșterea cantitativă a substanței fundamentale. În raport cu sinteza de ADN interfaza se subîmparte în următoarele trei perioade (fig. 1-14):

— *perioada* G_1 (engl. *gap=gol*, hiatus), în care nu se sintetizează ADN (repaus mitotic sau stare de „somn celular") de exemplu 90% din celulele stem în condiții fiziologice;

— *perioada S* în cursul căreia are loc dublarea cantității de ADN, respectiv a materialului genetic al celulei (de la 2 C la 4 C);

— *perioada* G_2, în care sinteza de ADN încetează.

b) *Mitoza propriu-zisă* (kineza sau faza distributivă) se împarte în 4 faze pro-, meta-, ana- și telofaza* (fig. 1-15):

— *Profaza.* În interiorul nucleului cromatina se dispune în filamente (spirem) avînd la început un aspect de ghem strîns cu fire subțiri; ulterior ghemul devine mai lax, cu formațiuni spiralate mult mai groase din care se individualizează cromozomii. Concomitent cu modificările nucleare, au loc modificări citoplasmatice,

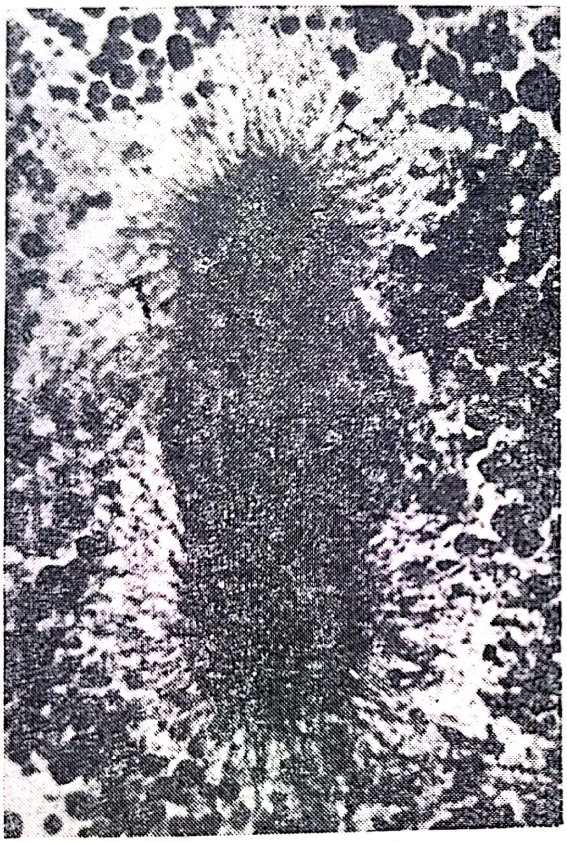
Fig. 1-15. Reprezentare schematică a ciclului mitotic cu principalele caracteristici ale celor 4 etape ale mitozei propriu-zise.

în primul rînd prin formarea polilor în vederea diviziunii (fig. 1-16). Înainte de începutul cariokinezei propriu-zise, centrozomul se divide și cele două jumătăți se îndreaptă spre cele două extremități ale celulei; astrosferele lor sînt unite prin fibrile care, în ansamblu, formează *fusul de diviziune*. La sfîrșitul profazei cromozomii se adună la mijlocul celulei cu centromerul aplicat pe aceste fire.

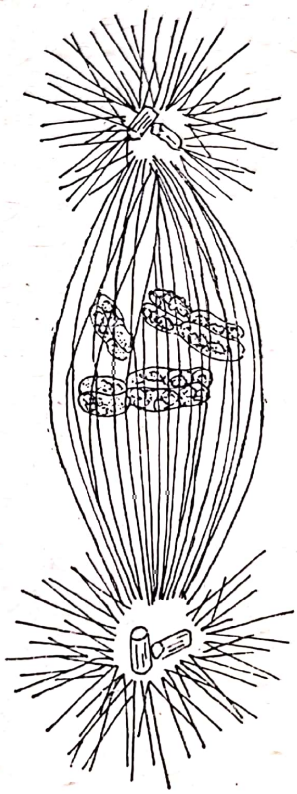
---

* cuv. gr. *pro*=înainte, *meta*=după, *ana*=aceeași cantitate, *tele*=departe, *phasis*=fază, aparență.

— *Metafaza* se caracterizează prin dispoziţia cromozomilor într-un singur plan, perpendicular pe mijlocul fusului de difiziune (ecuatorul celulei), formînd *placa ecuatorială*. În această fază cromozomii sînt bine individualizaţi, plutesc în sucul nuclear (cariolimfă), putînd fi bine studiaţi morfologic. Ei se orientează cu porţiunea unghiulară spre axul longitudinal al celulei. La sfîrşitul acestei faze cromozomii se scindează longitudinal în perechi, rezultînd pentru fiecare cromozom cîte două cromatide surori.



A



B

Fig. 1-16. Mitoză în stadiul de metafază (după W. Specht, 1961). *Stînga* (A): la cei doi poli ai celulelor în diviziune se observă centrii celulari, legaţi între ei de fusul de diviziune sau fusul acromatic; în mijlocul fusului se văd cromozomii, dispuşi în placă ecuatorială. În jurul aparatului mitotic se disting organite citoplasmatice. (Mărire de 12 000 ×). *Dreapta* (B): un desen după o imagine electronomicroscopică a ultrastructurii aparatului mitotic şi a cromozomilor în metafază cînd cromozomii se aliniază în partea mediană a fusului de unde migrează spre cei doi poli ai celulei.

— *Anafaza* se caracterizează prin separarea cromatidelor surori, care devin cromozomi independenţi, ce încep să migreze spre cei doi poli ai celulei (dînd impresia că sînt „traşi de frînghii" către centriolul respectiv) prin contracţia fibrelor fusului, ataşate de centromere. În cursul acestei deplasări, fiecare cromozom apare flectat. Se presupune că cromozomii migrează spre cei doi poli datorită faptului că fibrele fusului ar conţine proteine contractile, similare cu fibrele musculare (actomiozina). În zona ecuatorială celula începe să schiţeze o strangulare ce se adînceşte în faza următoare.

— *Telofaza* este ultima fază a mitozei în care cromozomii au ajuns la cei doi poli ai celulei. La începutul telofazei cromozomii sînt încă distincţi, apoi încep să recapete aspectul de filamente din ce în ce mai fine, pînă cînd contururile lor dispar, în timp ce în jurul lor se constituie membrana nucleară; ulterior îşi fac apariţia nucleoli. Cariokineza este completată de *citodiereză* (citokineză) care constă

Scanned with OKEN Scanner

în formarea unei membrane despărțitoare între cele două celule, cu care se încheie procesul de diviziune citoplasmatică.

Durata unei mitoze este de aproximativ o oră, cu limite între 1/2 oră și 3 ore. Cele 4 faze mitotice diferă ca durată, avînd, cu aproximație, următoarele valori: profaza 25—30 minute, metafaza 10—15 minute, anafaza 5 minute și telofaza 15—20 minute.

2) *Meioza* (sau diviziunea reducțională) reprezintă tipul de diviziune celulară prin care, din celule diploide (2 N) rezultă *celule hiploide* (N) (cuv. grec. *haplous* = simplu, unic, *eidos* = formă). Pentru realizarea acestei reduceri sînt necesare două diviziuni celulare succesive, în cursul cărora cromozomii nu se divid decît o singură dată.

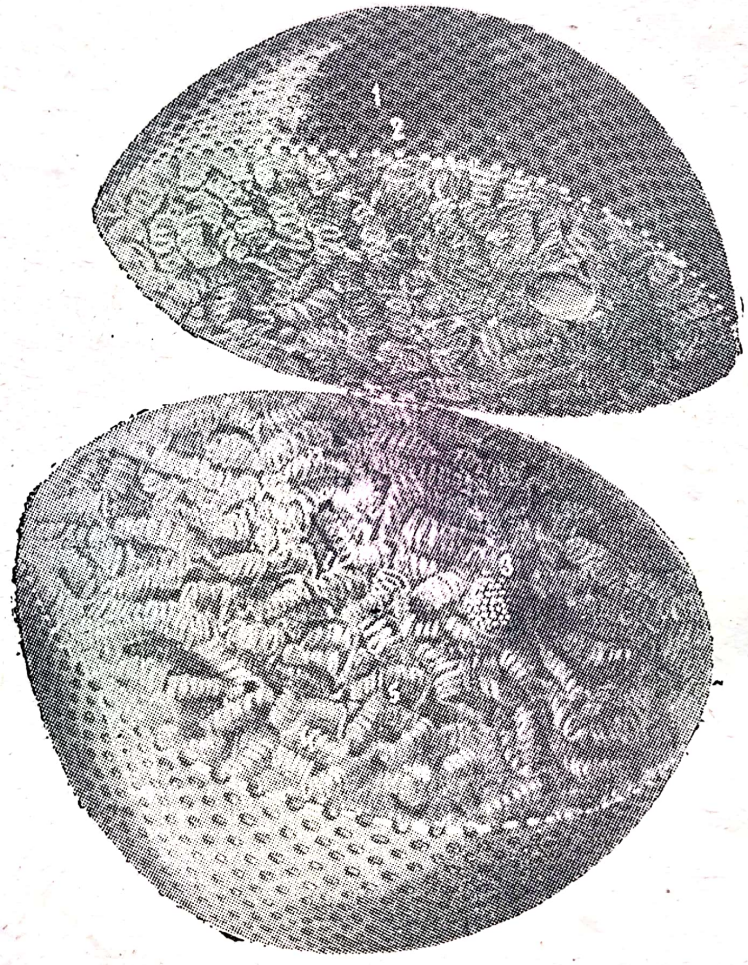


Fig. 1-17. Stereograma nucleului (după P. Raicu și colab., 1972).

În interiorul membranei nucleare, perforată de pori, se găsește substanța fundamentală în care sînt așezate, în anumită ordine, structuri spiralare de lanțuri ADN care conțin codul genetic al speciei și nucleoli. *Legenda:* 1=membrana nucleară; 2=pori; 3=nucleoli; 4=cromatide; 5=carioplasmă.

În prima diviziune meiotică, dintr-o celulă mamă diploidă, se realizează două celule haploide, prin simplă separare a cromozomilor omologi (redistribuire). În a doua diviziune se produce o separare longitudinală a cromatidelor din cei doi nuclei haploizi (diviziune de tip mitotic), ducînd la formarea a patru nuclei haploizi. După cea de-a doua diviziune are loc un proces de maturație din care

Scanned with OKEN Scanner

rezultă celulele sexuale mature sau gameții (spermatozoidul și ovulul). Prin fecundare, zigotul ajunge să aibă iarăși două seturi de cromozomi. Dacă nu s-ar realiza înjumătățirea numărului de cromozomi la celulele sexuale, numărul lor s-ar dubla de fiecare generație (4 N, 8 N etc.) de unde ar rezulta celule cu număr nelimitat de cromozomi. În felul acesta se păstrează, din generație în generație, numărul de cromozomi diplozi caracteristic pentru fiecare specie. Diviziunea meiotică are aceleași faze ca și diviziunea mitotică, cu unele diferențe de detaliu.

Spre deosebire de mitoză, în care celulele rezultate au zestrea genetică completă a celulei de origine, conținută în ambele seturi de cromozomi, prin meioză, gameții rezultați primesc informația genetică conținută într-un singur cromozom omolog (dintr-un set sau din celălalt, la întîmplare), rezultînd o recombinare a caracterelor alelice. Prin fecundație are loc o completare a materialului cromozomial prin aport de material genetic „străin", care mărește imens posibilitățile de asortare diferită a caracterelor (vezi pag. 65).

c. **Cromozomii*** sînt unități structurale ale nucleului pe care sînt plasate genele linear, într-o ordine strictă, determinînd transmiterea „în grup" a caracterelor respective în procesul de asortare a materialului genetic. Ei nu sînt vizibili decît în perioada diviziunii celulare, deși există permanent în celule sub formă de „cromatină nucleară" (fig. 1-17). Componenta lor principală este acidul dezoxiribonucleic (ADN), care are rolul de conservare (depozitare) și transmitere a informației genetice (69, 235, 242, 244).

1) *Morfologie.* Particularitățile morfologice ale cromozomilor pot fi observate cel mai bine în cursul metafazei; datorită condensării maxime a materialului component, ei apar ca structuri compacte, bine delimitate și intens colorate.

Mărimea cromozomilor umani variază de la 1 la 10 μ lungime, cu o grosime de circa 3 μ. Cei mai mari cromozomi cunoscuți se găsesc în celulele glandelor salivare ale dipterelor (1 200 μ), iar cei mici pot fi sub forma de grunji mici, sub puterea de separare a microscopului optic. După mărimea lor, cromozomii umani se împart în 3 grupe: mari, mijlocii și mici.

Numărul cromozomilor dintr-o celulă somatică este constant pentru fiecare specie. La om numărul cromozomilor este de 46 (celulă somatică diploidă cu două seturi de 23 de cromozomi), provenită din unirea zestrei haploide a celor doi gameți care aduc fiecare „o zestre" egală de cromozomi. Cromozomii care fac parte din aceeași pereche se numesc *cromozomi omologi.*

Numărul cromozomilor variază mult la diferite viețuitoare, astfel o specie de vierme nematod (ascarid) are numai 2 cromozomi în celulele somatice (2 N) și un singur cromozom în celulele sexuale (haploide), pe cînd celulele glandei salivare la unele insecte au 20 000 și chiar 100 000 de cromozomi. Numărul cromozomilor nu are nici o legătură cu gradul de evoluție pe scara filogenetică, importantă fiind calitatea materialului genetic cuprins în ei. Alte exemple de număr cromozomial la cîteva specii de plante și animale: spanacul 12, bumbacul 52, țînțarul 6, musca 12, broasca 22, pisica și porcul 38, oaia și melcul 54, calul 64, găina și cîinele 78.

Forma cromozomilor variază cu specia și cu faza diviziunii celulare; la om ei sînt constituiți din două filamente alipite care reprezintă exemplare identice ale materialului genetic, numite *cromatide.* Locul de unire a cromatidelor se numește *centromer* (fig. 1-18).

---

* Derivă de la cuvintele grecești *chroma*=culoare și *soma*=corp.

Scanned with OKEN Scanner

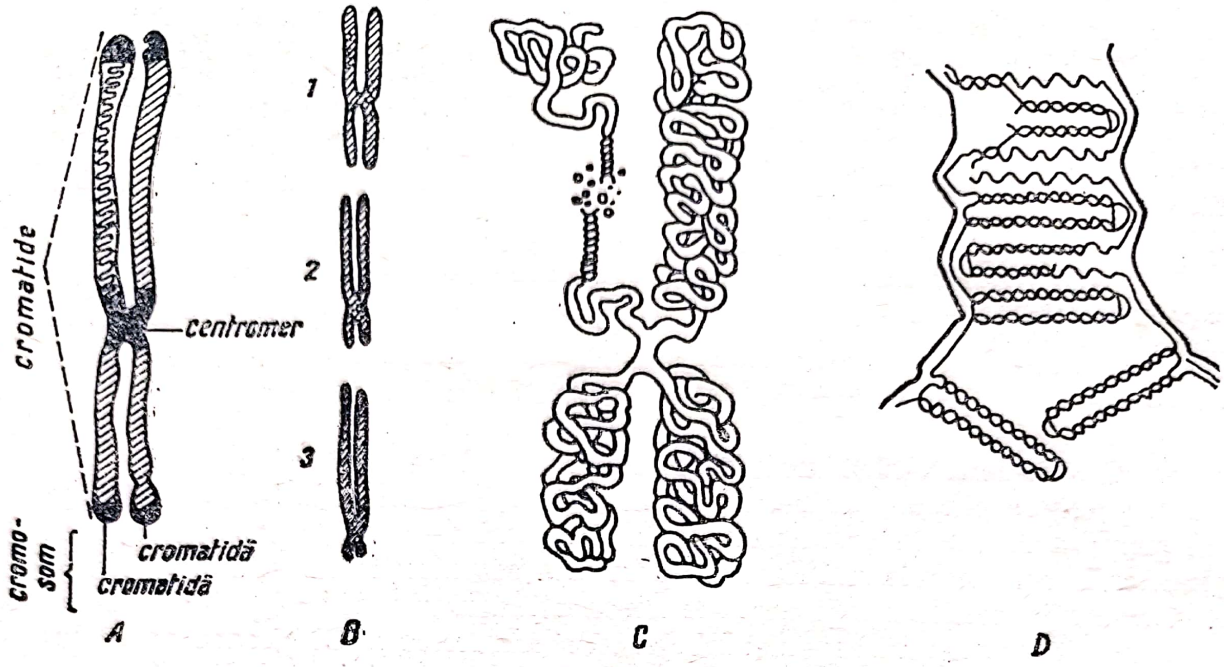


Fig. 1-18. Schema structurală a cromozomilor.

A. Componentele unui cromozom în metafază. B. Tipuri de cromozomi la microscopul optic; centromerul are totdeauna o poziţie fixă pentru perechea respectivă; în funcţie de dispoziţia centromerului, cromozomii se împart în: 1 — metacentrici; 2 — acrocentrici; 3 — telocentrici. C. Organizarea structurală, puternic plicaturată, a unui cromozom. D. Model ipotetic al plicaturării şi replicării lanţurilor polinucleotidice, propus de Taylor în 1963. Această formă reprezintă structura terţiară, tridimensională a acizilor nucleici.

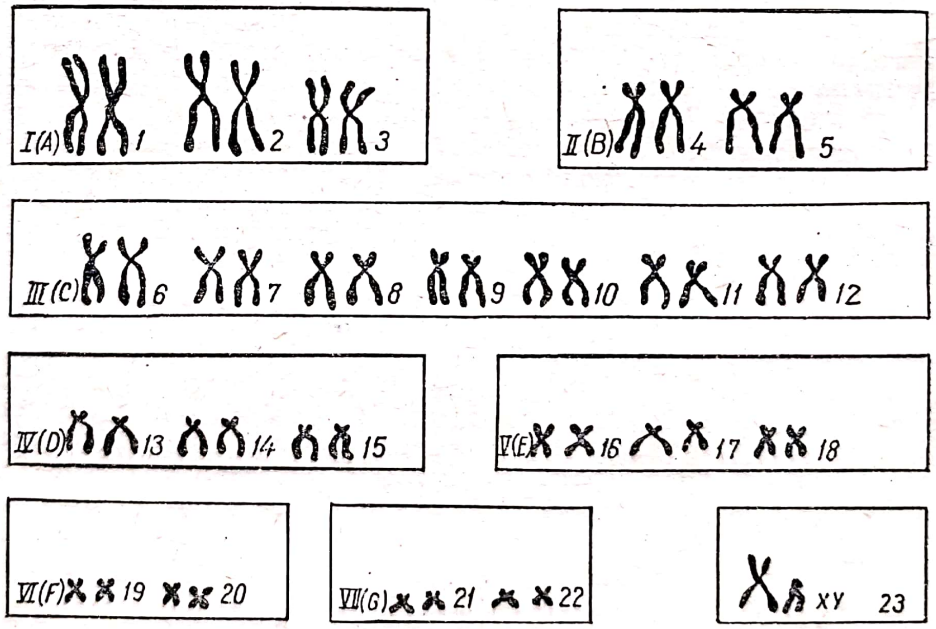


Fig. 1-19. Cariotipul uman al unui bărbat.

Cele două seturi de cromozomi sînt alcătuite din 44 cromozomi somatici (autozomi) şi din 2 cromozomi sexuali diferiţi (heterozomi), X şi Y (perechea 23).

2) *Studiul cromozomilor în patologia umană. Citogenetica* este o ramură a geneticii care se ocupă cu studiul modificărilor cromozomiale cu aplicații importante în patologie.

Cariograma. Morfologia diferită a cromozomilor permite identificarea, individualizarea și determinarea cariotipului speciei respective (cuv. gr. *karyon*=nucleu). Aceasta poate fi stabilită prin studierea celulelor în curs de diviziune, în stadiul de metafază și aranjarea cromozomilor, pe baza imaginilor fixate pe hîrtia fotografică, în perechi de cromozomi omologi, în ordinea descrescîndă a mărimilor. Cariotipizarea permite determinarea unor aberații numerice și structurale ale cromozomilor (133, 241). Clasificarea actuală a cromozomilor umani este dată în fig. 1-19; ea se bazează pe propunerile comisiilor întrunite la Denver (1960), Londra (1963) și Chicago (1966).

La om, perechile 1—22 sînt *cromozomi nesexuali* (numiți și cromozomi somatici sau autozomi) iar perechea 23 reprezintă *cromozomii sexuali* (numiți și heterozomi sau gonozomi). Cromozomii sexuali la femeie sînt identici ca formă și mărime, și se notează cu XX; la bărbat sînt neidentici: un cromozom X și altul în formă de Y. Spermatozoizii, care au un număr haploid de cromozomi, conțin cîte un singur cromozom sexual, fie Y fie X, pe cînd ovulele conțin tot cîte un singur cromozom sexual, dar numai de tip X.

Observarea directă a cromozomilor s-a dovedit insuficientă pentru determinarea certă a cariotipului uman și a variantelor lui patologice. Pentru a realiza o „discriminare" mai sensibilă s-au adăugat alte metode, ca studiul în *lumina fluorescentă, autoradiografia, denaturarea* și altele.

II. ELEMENTE DE GENETICĂ

A. NOȚIUNI DE GENETICĂ MOLECULARĂ

*Genetica** este știința care studiază legile eredității, variabilității și a determinismului caracterelor. Prin *ereditate*** se înțelege transmiterea de la părinți la descendenți (progeni***) a caracterelor și funcțiilor anatomice, celulare și moleculare care asigură, de-a lungul generațiilor, asemănările cu înaintașii. În afară de acest aspect conservator al eredității, genetica se ocupă de mecanismele modificărilor acestor caractere (care, odată instalate, se transmit de-a lungul generațiilor), fenomen numit *variabilitate*. Fixitatea caracterelor nu are decît o valabilitate relativă; este suficient să amintim că viața pe pămînt a apărut înainte cu 3 miliarde de ani într-o formă rudimentară și a evoluat pînă la complexitatea biologică din vremurile noastre, al cărei apogeu o reprezintă ființa umană. Termenul de *determinism* genetic se referă la modul și gradul de manifestare a carac-

* cuv. gr. *gennao*=a naște

** cuvînt lat. *hereditas*=moștenire

** cuv. lat. *progenies*=urmaș

Scanned with OKEN Scanner

terelor în cursul dezvoltării ontogenetice, ele apărînd numai în anumite momente ale ei și numai la anumite celule ale organismului, ca rezultat al unor mecanisme reglative complexe ce acționează la nivelul aparatului genetic (123, 211, 258, 335).

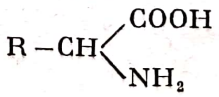
Determinismul genetic prezintă un aspect *calitativ* și altul *cantitativ*, stabilindu-se *cînd* și *cîtă* proteină să se sintetizeze de către o celulă. În primul caz exemplificăm apariția diferitelor tipuri de hemoglobine caracteristice anumitor faze ale dezvoltării ontogenetice, sau însuși fenomenul diferențierii celulare; în al doilea caz exemplificăm limitarea sintezelor de proteine (enzime) la cantitatea necesară trebuințelor fracționale.

Pentru îndeplinirea acestor funcții este necesară existența unui aparat specializat „aparatul genetic" care este însuși nucleul celular conținător al materialului genetic, substrat al funcțiilor genetice, constituit din punct de vedere chimic, din acizi nucleici. Pionierii geneticii moderne au deschis căile către patologia moleculară, prin descoperiri epocale a căror importanță pentru medicină egalează pe aceea a descoperirii microorganismelor (56, 95, 209, 258, 266).

1. NOȚIUNI DE BAZĂ DESPRE STRUCTURA PROTIDELOR

Proteinele reprezintă substratul biochimic al fenomenelor vitale; complexitatea lor structurală foarte mare le face apte pentru reacții biochimice de mare finețe, în calitate de enzime, anticorpi, transportori sanguini de diverse substanțe, hormoni-proteine etc., care stau la baza proceselor biologice. De aceea, sinteza proteinelor este actul fundamental prin care materia vie se autoreproduce; toate celelalte sinteze sînt derivate din acestea (112, 295).

a. **Acizii aminați.** Pietrele de construcție ale proteinelor sînt cei 20 de acizi aminați codificați genetic; dintre aceștia 8 sînt esențiali, organismul uman neputîndu-i sintetiza; ei trebuie să fie aduși prin alimentație. După cum arată denumirea, un acid aminat posedă două grupări funcționale caracteristice: gruparea bazică aminică ($—NH_2$) și gruparea acidă carboxilică (—COOH). Acizii aminați pot fi schematizați după formula:



Radicalul (R) reprezintă catena laterală, care imprimă individualitatea fiecărui acid aminat, fără să-i modifice structura axială. Fiecare acid aminat poartă o denumire chimică completă și una uzuală; pentru evitarea denumirilor lungi s-a introdus simbolizarea prin trei litere a denumirii lor uzuale (simboluri „stenografice"). Cel mai simplu acid aminat este glicocolul sau glicina (Gli), cu radicalul format numai dintr-un atom

de hidrogen. Ceilalţi 19 au diferiţi radicali mai mult sau mai puţin diversificaţi (fig. 1-20).

b. **Peptide.** Din combinarea a două sau mai multe molecule de acizi aminaţi rezultă substanţe numite peptide (di-, tri-, polipeptide). Peptidele cu un număr restrîns de acizi aminaţi (2 pînă la 10) se numesc oligopep-

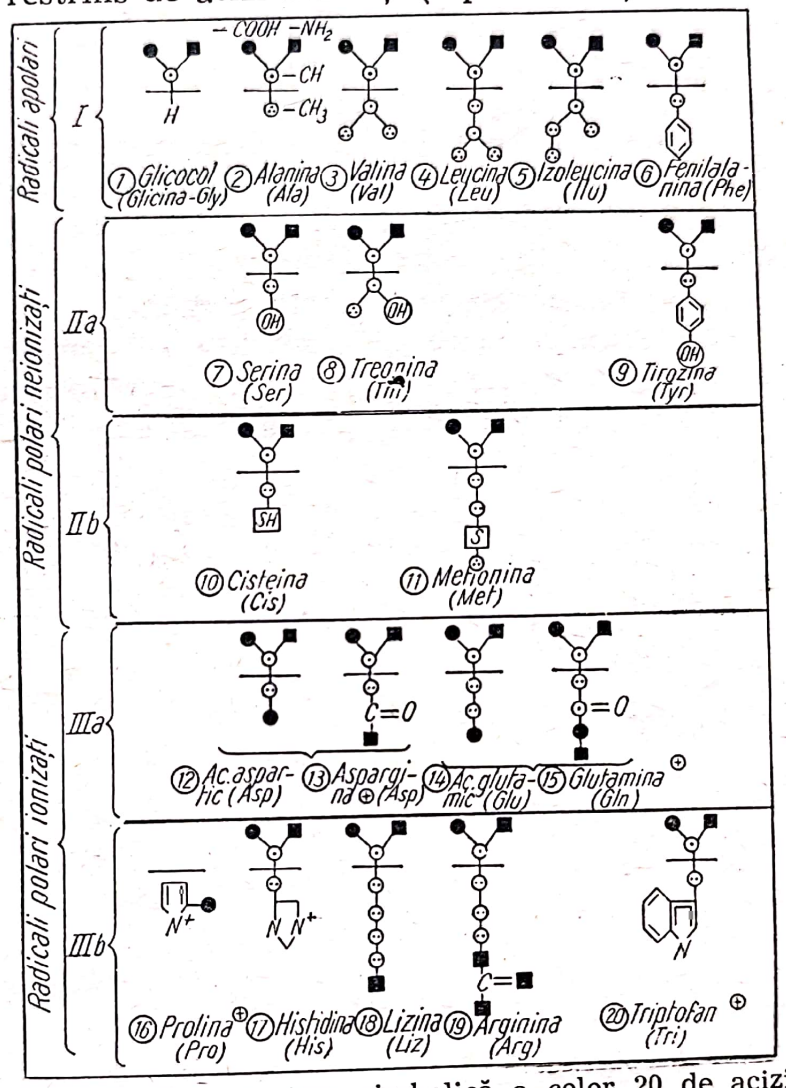


Fig. 1-20. Reprezentare simbolică a celor 20 de acizi aminaţi care intră în compoziţia proteinelor.

Acizii aminaţi (în afară de prolină) au o *componenţă comună* (HOOC — CH — NH_2) (figurată aici deasupra liniilor scurte orizontale) şi o *componentă variabilă* (— R) (figurată sub aceste linii. *Legendă:* cerc negru = —COOH; pătrat negru=—NH_2; cerc cu 3, 2 şi 1 puncte=grup hidrocarbonat (—CH_3, —CH_2 sau —CH). Acizii aminaţi ai căror grupări laterale au calitatea de a se disocia în soluţii apoase, pot fi grupaţi în radicali „polari" şi „apolari". După tipul de disociere electrolitică, un acid aminat poate fi prezent într-o soluţie sub formă acidă (H^+), bazică (OH^-), sau în soluţie hidrică (cînd ambele grupări sînt disociate). Gruparea —COOH are o încărcare negativă ($—COO^-$), iar gruparea —NH_2, o încărcare pozitivă ($—NH_3^+$). Majoritatea acizilor aminaţi, sînt electric neutri (apolari şi neionizaţi). Cei patru acizi aminaţi cu asteriscuri nu aparţin grupelor la care au fost trecuţi (pentru criterii pur structurale); astfel prolina (singurul acid aminat care nu respectă structura de bază) şi *triptofanul* (heterociclu azotat) aparţin grupului I, iar *asparagina* şi *glutamina* grupului III.b.

tide. Diferențierea dintre un lanț polipeptidic mare și o proteină cu moleculă mică este arbitrară; în general se consideră proteine lanțurile polipeptidice cu o greutate moleculară mai mare de 10 000 (macropeptide), sau cu un număr de acizi aminați mai mare de 100, dar sînt numeroase excepții de la această regulă.

c. **Proteine.** Proteinele sînt macromolecule alcătuite din lanțuri lungi de acizi aminați. Spre deosebire de polizaharide (glicogen), proteinele sînt polimeri cu lanț neramificat. Pînă în prezent nu se cunoaște limita superioară a numărului de acizi aminați într-un lanț polipeptidic unic. Dintre proteinele dispuse într-un singur lanț se știe că serum-albumina (cu greutate moleculară apropiată de tetramerul de hemoglobină) este formată dintr-o singură catenă cu un conținut de aproape 600 de acizi aminați.

Numărul enorm de secvențe amino-acidice diferite, realizabile în lanțul polipeptidic, corespunde unei qvasi-infinități de proteine diferite, teoretic posibile. Toate moleculele unei anumite proteine prezintă aceeași secvență de acizi aminați, determinată genetic, care imprimă unei proteine

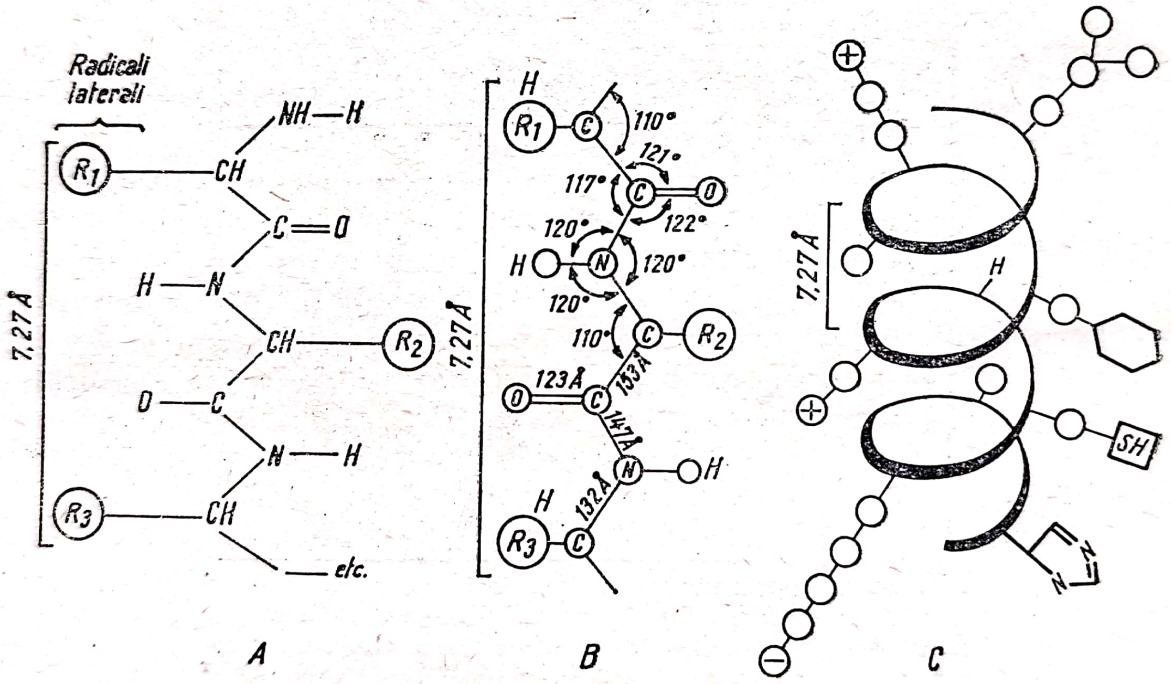


Fig. 1-21. Structura plană și spațială a unui fragment de lanț polipeptidic.
Toți cei 20 de acizi aminați, indiferent de mărimea radicalilor lor laterali, ocupă porțiuni egale din lungimea axială și au aceeași valoare în alcătuirea lanțului polipeptidic. Atomii, care realizează legăturile peptidice, formează între ei unghiuri de o anumită mărime, ceea ce creează o dispoziție a lanțului polipeptidic sub forma unei spirale cu pasul de 7,26 Å, care cuprinde, într-o turație completă, 3,6 acizi aminați; această spirală constituie „coloana vertebrală" peptidică. Radicalii (mici sau mari, polari sau apolari), sînt „înfipți" perpendicular în axul principal. Această dispoziție poate fi comparată cu o „plantă agățătoare" încolăcită în jurul unui stîlp imaginar; „tulpina plantei" este reprezentată de legăturile peptidice, iar „frunzele și florile", de radicalii laterali (apolari sau polari). Dispoziția în spirală a structurii lineare primare a fost numită de Pauling și Corey, α helix. *Legenda:* A=formula chimică de bază cu legăturile peptidice; B=distanțele și unghiurile dintre atomi; C=dispoziția lanțurilor în α helix (cu și fără sarcini electrice) ale radicalilor laterali.

cu o structură definită corespondentului ei funcțional. În afară de rolul funcțional al structurii de asamblu a moleculei, la majoritatea proteinelor, specificitatea de acțiune este legată de o porțiune limitată a moleculei numită zonă activă sau centru activ.

După tipul legăturilor chimice a componentelor care alcătuiesc o macromoleculă proteică, pot fi descrise mai multe *nivele de organizare moleculară:*

— *structura primară* (sau liniară) rezultă din tipul, ordinea și numărul acizilor aminați (totdeauna identice pentru același lanț polipeptidic, determinate genetic), aceștia fiind legați între ei prin legături peptidice;

— *structura secundară* reprezintă dispoziția în spirală sau în linie a lanțului peptidic primar (fig. 1-21); în cazul lanțului de hemoglobină, structura secundară spiralată a componentei proteice se întîlnește într-o proporție de circa 70% (vezi și fig. 5-11);

— *structura terțiară* a moleculei proteice se caracterizează printr-o dispoziție tridimensională, determinată de atracția sau respingerea grupărilor polare ale radicalilor laterali ai acizilor aminați; aspectul spațial al proteinelor diferă după cum dispoziția este *fibrilară* (lanț linear de sute de acizi aminați dispuși în mănunchi de 3 fibre în spirală — de exemplu tricicle de colagen) sau *globulară* în care acizii aminați sînt dispuși sub formă de ghem, prin plicaturarea specifică a lanțului primar, dispus pe alocuri în helix; aceste replieri sînt determinate de forțele necovalente și uneori de legăturile covalente dintre radicalii laterali; toate proteinele cu aceeași secvență de acizi aminați se „incurbează" totdeauna identic;

— *structura cuaternară* reprezintă o configurație particulară rezultată din asocierea unor subunități de lanțuri polipeptidice numite monomeri sau protomeri; ele cuprind, în gereral, un număr pereche de catene (2, 4 sau multiplii lor); cele mai cunoscute structuri cuaternare ale moleculelor proteice sînt tetramerul de hemoglobină (fig. 5-11), molecule de feritină (fig. 6-7), structura imunoglobulinelor (fig. 7-21);

— *structura pentenară;* unele proteine care au deja o structură cuaternară se pot asocia în molecule mai mari (de exemplu, globulinele IgM). În aceste cazuri este vorba de o structură supracuaternară sau pentenară. În cazul hemoglobinei, structurile pentenare apar numai în cazuri patologice (tactoizii din siclemie, corpii Heinz etc.).

d. **Proteide.** Proteinele se combină adeseori cu grupări care nu sînt alcătuite din acizi aminați. Fracțiunile neproteice de care se leagă unele proteine se numesc *grupări prostetice,* iar substanțele care rezultă sînt *heteroproteine* sau *proteide.* Grupările prostetice pot fi foarte diferite: glucide (gluco-proteine), lipide (lipo-proteine), aicizi nucleici (nucleoproteine), acizi fosforici (fosfoproteine), metale (metalo-proteine) etc. Grupările prostetice se leagă de radicalii laterali prin legături covalente puternice (50—100 Kcal/mol) sau necovalente slabe (1—7 Kcal/mol). Incorporarea grupării hem între „pliurile" lanțurilor proteice de globină dă

Scanned with OKEN Scanner

naştere hemoglobinei; cooperarea dintre cele două grupări conferă moleculei proprietăţi funcţionale noi, superioare, pe care nu le au în mod izolat, nici proteina simplă, nici grupul prostetic.

2. ACIZII NUCLEICI

Acizii nucleici sînt polimeri macromoleculari de nucleotide. Ei intră în componenţa celulară a tuturor vieţuitoarelor, fiind păstrătorii şi transmiţătorii materialului genetic. Acizii nucleici reprezintă elementele de bază ale procesului de autoreproducere; sinteza lor apare odată cu primele forme de organizare a materiei vii (9, 58, 89, 137, 190, 266).

a. **Nucleotidele.** Un nucleotid este alcătuit dintr-o *bază azotată,* un *monozaharid* şi un radical *fosfat.*

1) *Bazele nucleotidelor* sînt heterocicli azotaţi; ele sînt de două tipuri: baze *pirimidinice* şi *purinice.*

— *inelul pirimidinic* este un heterociclu cu 2 atomi de azot; derivaţii pirimidinici ce iau parte la structura acizilor nucleici sînt *citozina, uracilul* şi *timina;*

— *purinele şi derivaţii purinici* au o structură biciclică compusă dintr-un inel pirimidinic fuzionat cu un pentaciclu, imidazolul alcătuind un heterociclu imidazol-pirimidinic. Derivaţii purinici din structura acizilor nucleici sînt *adenina* şi *guanina* (25).

Bazele azotate ce intră în constituţia acizilor nucleici diferă parţial, după tipul de lanţ cărora le aparţin. Fiecare lanţ conţine 4 tipuri de baze azotate din care 3 sînt comune pentru ADN şi ARN; a patra este diferită: *timina* intră în componenţa ADN, iar *uracilul* intră în componenţa ARN (fig. 1-22).

ADN se găseşte în nucleu, pe cînd ARN se găseşte în proporţie redusă în nucleu (ARN „în tranzit"); cea mai mare cantitate se găseşte în citoplasmă (circa 90%). Acizii nucleici au putut fi transpuşi în stare de cristalizare; structura rezultată a permis studierea lor cristalografică cu ajutorul difracţiei cu raze X.

2) *Monozaharidele* acizilor nucleici sînt pentoze; după tipul de pentoză pe care o conţin, nucleotidele se împart în ribonucleotide, în care pentoza este o riboză şi dezoxiribonucleotide, în care pentoza este o dezoxiriboză (riboză cu o grupare —OH mai puţin); din polimerizarea lor rezultă acizii ribonucleici (ARN) şi acidul dezoxiribonucleic (ADN).

3) *Radicalul fosfat* (PO_4H^-), care intră în alcătuirea acizilor nucleici, are 3 grupări —OH libere din care 2 sînt esterificate (—OR_1 şi OR_2).

b. **Acidul dezoxiribonucleic** (ADN) formează materialul genetic primar, substratul materialului genetic al cromozomilor. Pentru ADN se descrie o structură primară şi una spaţială (secundară şi terţiară).

1) *Structura primară* reprezintă secvenţa nucleotidelor într-un lanţ polinucleotidic, în care elementul variabil constă în alternanţa

Scanned with OKEN Scanner

neregulată a celor 4 baze azotate care deosebesc nucleotidele între ele. Deşi componentele care alcătuiesc polimerul de ADN sînt molecule cu greutate moleculară relativ mică (circa 300), lanţul de ADN formează o macromoleculă cu greutate de ordinul sutelor de mii sau chiar a milioanelor.

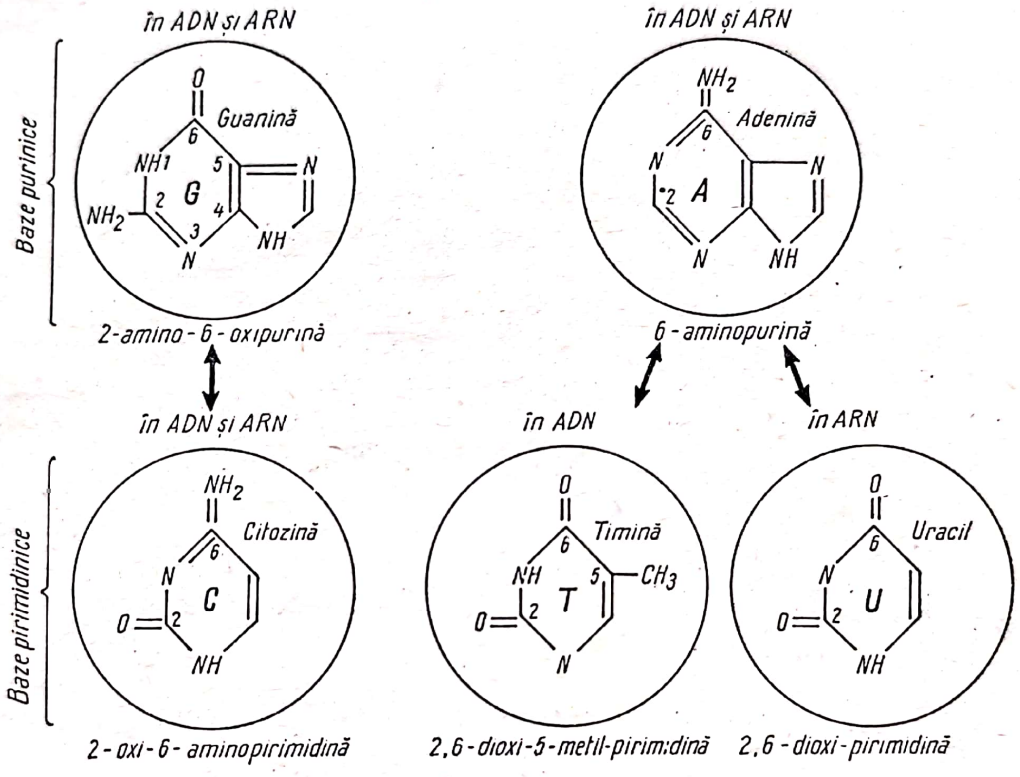


Fig. 1-22. Reprezentare schematică a grupării complementare a bazelor purinice şi pirimidinice în ADN şi ARN.

Pentru a fi complementare, bazele trebuie să se deosebească prin două elemente: să aparţină altui tip structural (purina cu pirimidina) şi să aibă alt radical în poziţia 6 (amină cu cetona). Astfel, adenina (amino-) se combină cu timidina (ceto-) iar guanina (ceto-) cu citozina (amino-). Caracteristicile principale ale compoziţiei moleculei de ADN sînt următoarele: suma bazelor purinice (A—G) este egală cu suma bazelor pirimidinice (C—T), suma bazelor aminate (A—C) este egală cu suma bazelor cetonice (G—T), iar cantitatea de acid dezoxiadenilic (A) este egală cu cantitatea de acid dezoxitimidilic (T) şi cantitatea de acid dezoxiguanilic (G), este egală cu cantitatea de acid dezoxicitidilic (C); raport A—T/G—C.

2) *Structura spaţială.* Molecula de ADN se prezintă sub forma a două catene cuplate, răsucite una în jurul celeilalte: *structură bicatenară spiralată* (266, 334). Corespondenţa bazelor de pe cele două lanţuri este supusă unei reguli stricte: o bază purinică corespunde totdeauna unei baze pirimidinice şi anume: *adenina timinei (A—T)* şi *guanina citozinei (G—C)*, iar împerecherea se face totdeauna între o bază 6-amino- şi o bază 6-ceto. În felul acesta structura unuia din lanţuri este determinată

sau determinantă pentru structura celuilalt lanț. Această *lege a complementarității bazelor*, stabilită de Watson și Crick, este una din legile fundamentale ale biochimiei genetice (334). Autorii ei au fost distinși, în 1962, cu premiul Nobel pentru medicină și fiziologie (fig. 1-23).

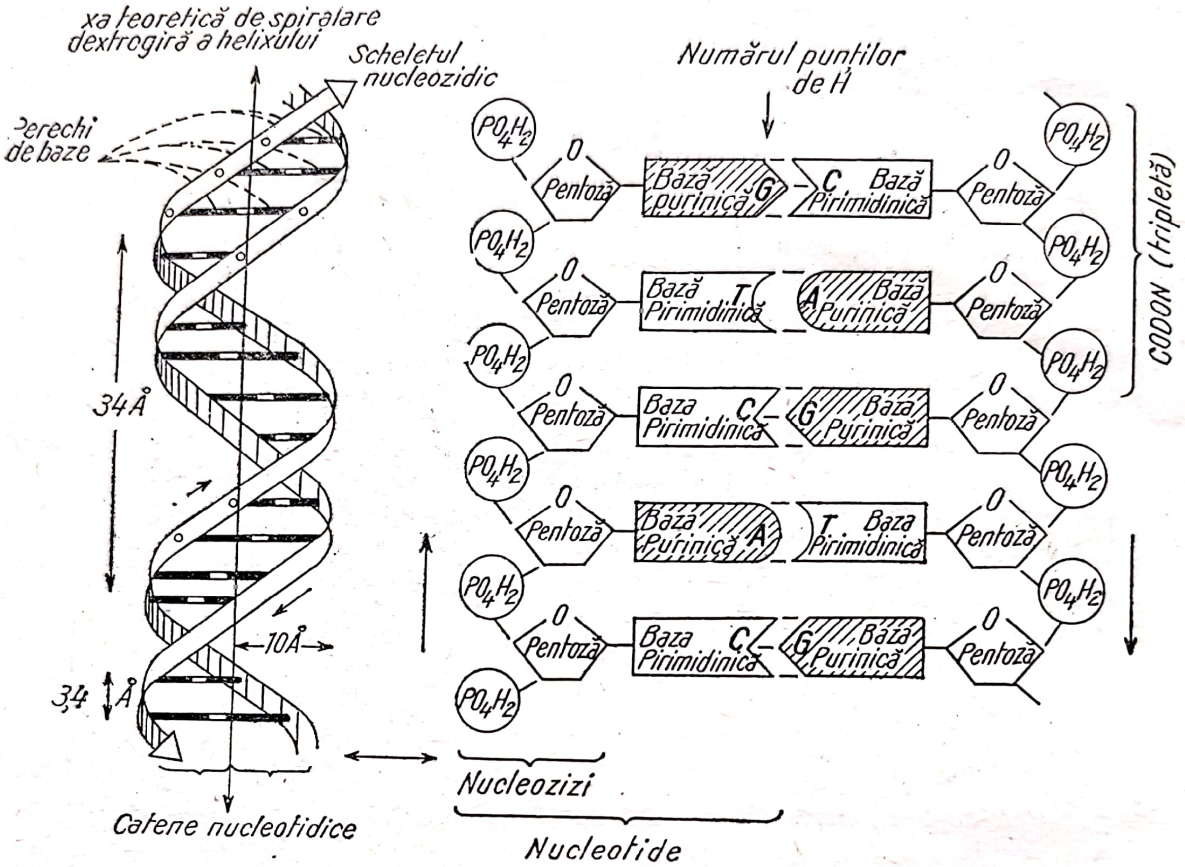


Fig. 1-23. Schema spațială a structurii bicatenare a moleculei de ADN (după Watson și Crick).

Stînga: structura helicoidală bicatenară a helixului ADN. Răsucirea celor două catene se face în jurul unui ax ipotetic situat central, unul în direcție ascendentă, iar altul în direcție descendentă. Structura spațială a moleculei dublu helicoidale de ADN poate fi comparată cu o scară în spirală ale cărei trepte sînt reprezentate de bazele azotate, iar balustradele, de secvențele alternative de dezoxiriboză-fosfat. *Dreapta:* structura desfășurată bicatenară de ADN. Bazele din interiorul lanțurilor răsucite stau față în față cu bazele corespunzătoare din celălalt lanț; ele sînt antiparalele și antagoniste; astfel dacă o catenă are o secvență de baze G, T, C, A, C etc., cealaltă se împerechează cu corespondentul C, A, G, T, G etc.

Una din deosebirile structurale esențiale dintre ADN și ARN este aceea că ADN se găsește sub forma complementară dublu helicoidală, în timp ce ARN se găsește sub formă monocatenară, care se poate însă autorăsuci pe anumite segmente unde se găsesc baze complementare.

Fibra lungă de ADN, cu o greutate moleculară ridicată, este puternic pliată în cromozomi, purtătorii unui număr extrem de mare de informații (vezi și fig. 1-18). Cu toată lungimea mare a moleculei de ADN și a existenței legăturilor de hidrogen dintre catene (care sînt de 10 ori mai slabe decît legăturile covalente), în condiții normale nu se produc rupturi sau

alte discontinuităţi. Spre deosebire de alte biomolecule din citoplasmă, molecula de ADN are o mare stabilitate metabolică.

c. **Acizii ribonucleici** (ARN) sînt, ca şi catenele de ADN, polimeri de nucleotide a căror funcţie este în relaţie directă cu ADN; ei sînt mediatorii sintezei de proteine şi, prin aceasta, ai întregii activităţi metabolice celulare. Celulele din organism fiind specializate pe funcţii diferite, doar o mică cantitate din informaţia conţinută în moleculele de ADN se transmite pentru a determina în citoplasma unei celule specializate, sinteza unei proteine specifice.

1) *ARN mesager (ARN-m)* prezintă o structură monocatenară polinucleotidică, copie a unui fragment de ADN; copierea mesajului genetic conţinut în ADN nuclear se face tot pe baza legii complementarităţii a lui Watson şi Crick (copie „în negativ", comparată cu un „mulaj în ceară"). Acest ARN a fost numit mesager, deoarece este purtătorul mesajului genetic pe care-l preia de la ADN şi-l transportă la sediul citoplasmatic al sintezei proteice, adică pe ribozomi, jucînd în continuare rolul de matrice. Greutatea moleculară şi, legat de aceasta, numărul de nucleotide şi constanta de sedimentare a ARN-m, sînt proporţionale cu lungimea mesajului pe care-l transmit. ARN-m reprezintă doar 2—3% din cantitatea de ARN celular; el se găseşte atît în nucleu, cît şi în citoplasmă. ARN-m este heterogen ca compoziţie, putînd exista cel puţin tot atîtea varietăţi cîte proteine există în organism. ARN-m este sintetizat în nucleu de către enzima ARN-polimeraza, după modelul acizilor nucleici. ARN-m manifestă o mare instabilitate; copiile purtătoare ale mesajului genetic persistă pe timpul necesar sintezei proteinelor respective.

2) *ARN de transfer (ARN-t)** formează structuri monocatenare de circa 80 de nucleotide. Rolul lor este de a asambla acizii aminaţi în cursul biosintezei proteinelor la nivelul ribozomilor pe matricea de ARN-m, fiind necesar cel puţin un ARN-t pentru fiecare acid aminat; în realitate, fiecare acid aminat dispune în medie de 3 sau 4 varietăţi de ARN-t. Acesta prezintă o dublă polaritate: la unul din capete el se combină cu acidul aminat pentru care are specificitate, iar în altă zonă a moleculei conţine 3 nucleotide care se unesc cu o secvenţă de 3 nucleotide complementare ale ARN-m (fig. 1-24).

3) *ARN ribozomial (ARN-r)* nu este încă bine cunoscut în ceea ce priveşte rolul lui în sinteza proteică; el se găseşte predominant în subunitatea ribozomială mare. ARN-r reprezintă 80—90% din întreaga cantitate de ARN celular; el are o structură monocatenară, care pe alocuri se răsuceşte realizînd porţiuni dublu catenare. Procentul ridicat de ARN-r apare probabil mai mare decît cel real, din cauza degradării ARN-m şi ARN-t prin procedeele folosite pentru izolarea acestor compuşi foarte fragili.

---

* ARN-t este menţionat în numeroase lucrări şi sub denumirea de ARN-s (solubil) deoarece rămîne suspendat în anumite condiţii de centrifugare a unui omogenat celular, sau de ARN adaptor, întrucît potriveşte acidul aminat în locul indicat de secvenţa de codoni a ARN-m.

Scanned with OKEN Scanner

d. **Sinteza acizilor nucleici.** Acizii nucleici se sintetizează în celulă pornind de la precursori simpli ca glicocolul, bioxidul de carbon, acidul formic, glucoza, fosfații. În biosinteza acizilor nucleici intervin numeroase etape metabolice intermediare. Un rol important în sinteza lor îl are acidul folic (FH_4) sub formă de folați cu rol de coenzime (fig. 1-25). Aci-

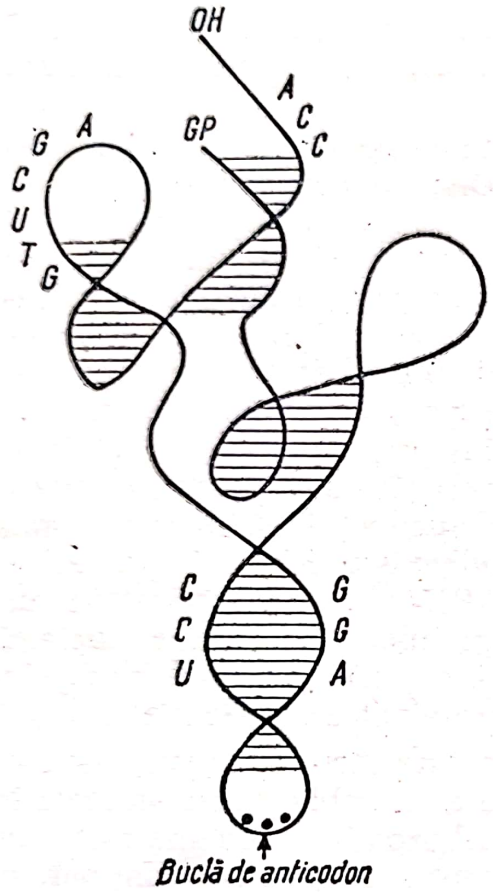


Fig. 1-24. Molecula de ARN-t.

Polimerul de ARN-m se găsește în stare monocatenară; dispoziția dublu helicoidală se realizează, pe alocuri, prin autorăsucire în segmentele unde se găsesc baze complementare. Această moleculă a fost comparată cu un fluture în zbor din cauza deselor răsuciri și dezrăsuciri. Zona autospiralată reprezintă circa 60% din moleculă. ARN-t prezintă o dublă complementaritate (specificitate). Bucla mediană, cu o lungime de trei nucleotide este complementară față de un codon de ARN-m (bucla anticodon). Una din extremități este mai lungă și prezintă o tripletă invariabilă (CCA), care se combină cu un acid aminat, același pentru tipul respectiv de ART-t. (123).

dul folic intervine atît în sinteza bazelor (comune pentru ADN și ARN), cît și în sinteza timinei (conținută numai în ADN), ceea ce explică tulburarea sintezei de ADN în deficitul folic. Rolul vitaminei B_{12} este indirect, acționînd prin metabolismul folaților.

În sinteza acizilor nucleici au fost demonstrate două căi metabolice: sinteza *de novo* a nucleotidelor din precursori simpli și reutilizarea nucleotidelor din acizii nucleici dezintegrați pentru formarea unor molecule noi (58, 139, 149, 297, 335).

e. **Nucleoproteinele.** În cromozomi, moleculele de ADN nu se găsesc ca simple lanțuri de polinucleotide, ci legate de anumite proteine bazice sub formă de nucleoproteine; o situație asemănătoare există și la nivelul ribozomilor.

Protaminele și histonele sînt proteine simple care se asociază structural cu lanțurile de ADN. Rolul acestor proteine nu este bine cunoscut; se consideră că ar fi în legătură cu protejarea informației genetice și cu inactivarea anumitor părți din materialul genetic. Ele constituie, mai mult decît ADN, antigenele nucleare împotriva cărora se formează anticorpii antinucleari din lupusul eritematos diseminat (295).

Scanned with OKEN Scanner

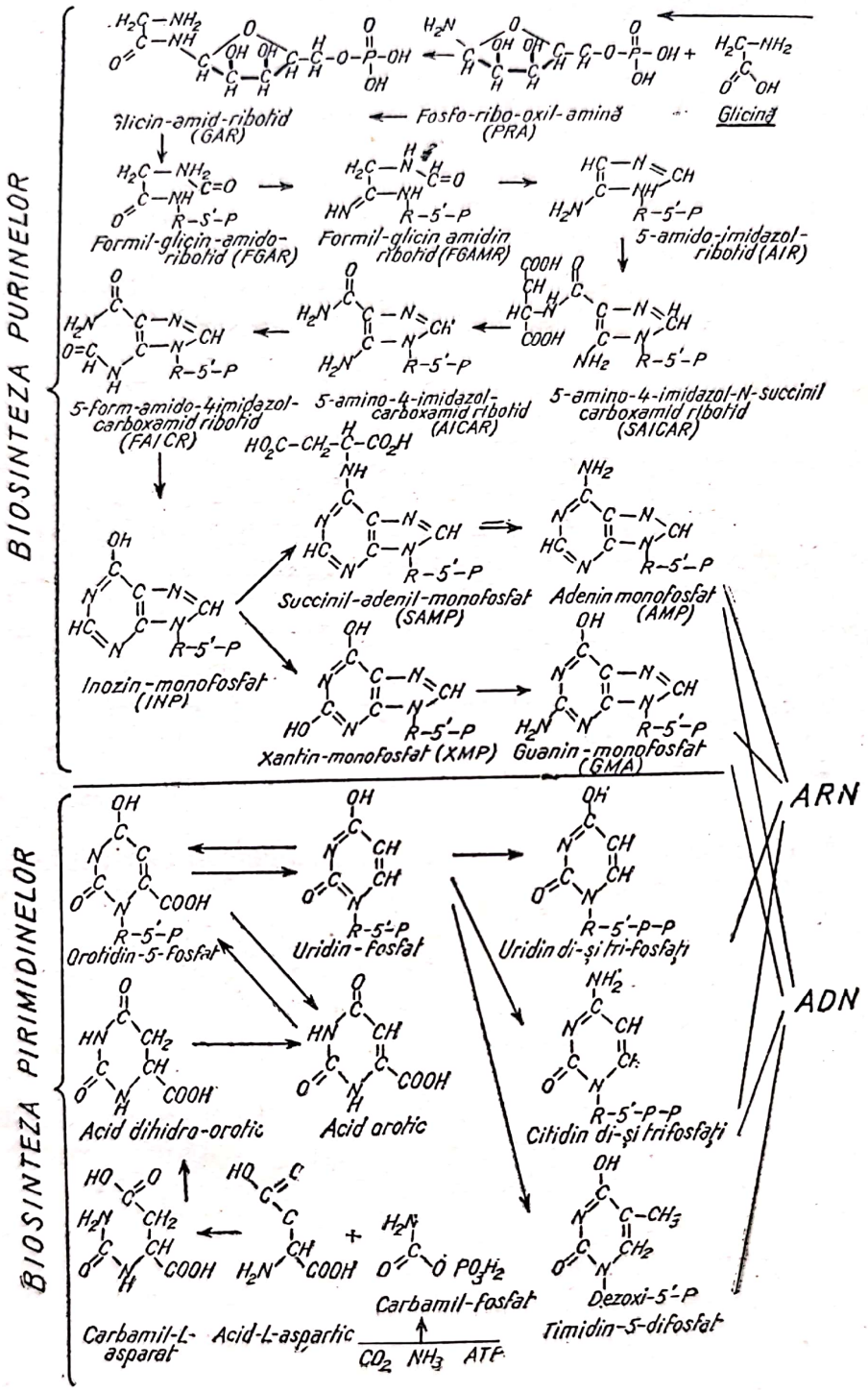


Fig. 1-25. Etapele principale de biosinteză ale moleculelor ARN și ADN și produșii intermediari, cei mai importanți, ai acestor sinteze (după J. W. Harris și R. W. Kellermeyer, 1970).

In sinteza bazelor purinice coenzima folică intervine în: transformarea glicid-amid-ribotidului (GAR), în formil-glicin-amid (FGAR); prin aceasta se introduce în nucleul purinic carbonul de la poziția 8; transformarea 4-amino-5 imidazol carboxamid ribotidului (AICAR), în 5-formamido-4-imidazol-carboxamid-ribotid (FAICAR); prin aceasta se introduce carbonul în poziția 2. *În sinteza timidilatului*, coenzimele folice intervin în metilarea nucleului pirimidinic, în poziția 5, prin acțiunea timidilat-sintetazei. Timidilatul fiind un component exclusiv al ADN, tulburarea în realizarea acestei sinteze explică apariția megaloblastozei, tulburare ce apare în deficitul, atît al acidului folic, cît și al vitaminei B_{12}. *Legenda:* R=riboză sau dezoxiriboză, R-5'-P=ribozo-5-fosfat.

3. TRANSFERUL INFORMAȚIEI GENETICE

Biosinteza proteinelor reprezintă activitatea de bază a materiei vii. Ea este inițiată de ADN cromozomial care, deși nu participă direct la această sinteză, deține mesajul genetic, „modelele cifrate" după care se „confecționează" moleculele de proteine. Biosinteza se încheie la nivelul ribozomilor, unde are loc asamblarea cu ajutorul ARN-t a acizilor aminați în lanțuri polipeptidice, în conformitate cu „matrița" de ARN-m. Biosinteza proteinelor constă, în ultimă instanță, din formarea de legături peptidice între cei 20 de acizi aminați într-o ordine genetic determinată. Calitățile morfologice și funcționale ale indivizilor și ale speciei din care fac parte depind de tipurile și calitatea reacțiilor metabolice, mediate de tot atîtea proteine-enzime, care la rîndul lor depind de „calitatea" informației înscrise în ADN. Calitățile fiecărei enzime în parte, cît și rezultatul final al cooperării tuturor proteinelor, alcătuiesc „forța" cu care este înzestrat un individ pe scară animală sau vegetală (117, 137, 186, 211).

În timp ce proteinele sînt sintetizate exclusiv ribozomial, pe baza codului genetic, celelalte entități biochimice care nu sînt cuprinse în sistemul de codificare (glucide, lipide, hem, săruri etc.) sînt la dispoziția locală a proteinelor-enzime care le sintetizează și le utilizează după necesitățile metabolice și după cantitatea care le este oferită din mediul înconjurător. Sinteza și înglobarea grupărilor prostetice în moleculele active se face deci „postribozomial", unele prin intermediul altor proteine-enzime.

a. **Copierea mesajului genetic.** Transmiterea mesajului genetic conținut în nucleul celular se face în două sensuri: în sens „vertical", prin procesul de înmulțire, asigurîndu-se identitatea materialului genetic la întreaga populație de celule din organism și în sens „orizontal" de la nucleu la citoplasmă. După Watson (334) *dogma centrală a geneticii* este transcrierea ARN după matrițele de ADN din care rezultă proteinele, după formula: ADN ⟶ ARN ⟶ proteine.

Pentru copierea informației genetice conținute în ADN este necesară desrăsucirea celor două catene complementare. După modelul fiecărei catene de ADN se formează, pe măsura desrăsucirii, cîte o nouă catenă complementară; procesul se petrece în prezența ADN-polimerazei și a nucleotidelor libere, prezente în mediu. Prin aceasta rezultă două duble helixuri identice, alcătuite fiecare dintr-o catenă veche și una nou sintetizată. Acest tip de sinteză replicativă se numește *sinteză semiconservativă*. Desperecherea longitudinală a lanțului bicatenar a fost asemănată de Watson și Crick cu litera Y; ea ar mai putea fi comparată cu un fermoar care se deschide și redeschide alternativ, însă numai pe anumite porțiuni. Sinteza unui lanț nou pe marticea veche presupune existența unor materiale preformate în mediul ambiant, adică a celor 4 tipuri de nucleotide legate de cîte un radical pirofosfat. Această formă trifosforică (activată) este indispensabilă pentru polimerizarea sub formă de catenă ADN sau ARN, prin așa-numitul „atac nucleofilic" (fig. 1-26).

b. **Codul genetic.** Viața poate fi considerată ca o etapă în istoria evoluției. Ea se datorește unor procese care stau la baza funcționalității

Scanned with OKEN Scanner

unor sisteme transmiţătoare de informaţie de la o generaţie la alta. Extrema varietate a speciilor vii a fascinat din cele mai vechi timpuri imaginaţia oamenilor. Speculaţiile filozofico-naturaliste învechite au cedat lent locul concepţiilor darwiniste asupra evoluţiei.

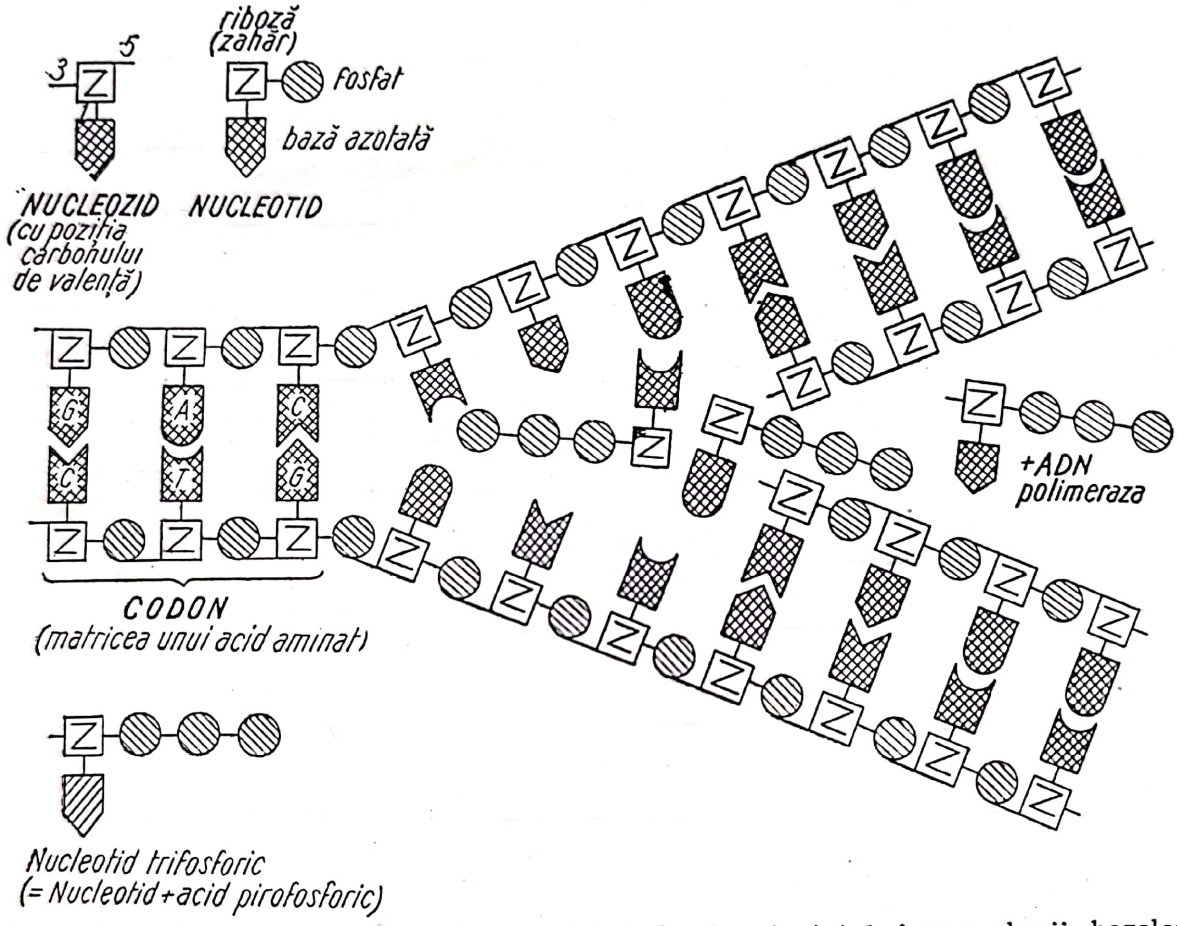


Fig. 1-26. Schema sintezei acizilor nucleici după principiul împerecherii bazelor. Filamentele dublului helix se desrăsucesc prin ruperea legăturilor de hidrogen dintre cele două lanţuri polipeptidice; ele servesc ca matrice pe care se fixează elementele complementare („fermoar parţial deschis"). După reduplicarea moleculei de ADN, fiecare dublu helix astfel format provine, jumătate din materialul vechi şi jumătate din elementele noi (hibridare); numai una dintre „şireturile" răsucite ale catenelor este activă. Amplasarea celor 4 tipuri de nucleotide la locul potrivit, cu restabilirea dublului helix, se face enzimatic prin intermediul ADN-polimerazei; energia necesară este furnizată de combinarea nucleotidului cu acidul pirofosforic devenind nucleotid trifosforic. *Legenda:* G (guanina) şi C (citozina), baze complementare ca şi A (adenina) şi T (timidina), se leagă prin 2, respectiv 3 punţi de hidrogen, reprezentate prin puncte.

Între părinţi şi copii se interpune o punte îngustă, dar fundamentală, care reprezintă ovulele şi spermatozoizii; acestea sînt „microseturi" de informare moleculară al cărei cod a fost astăzi scos din mister.

„Limbajul" genetic foloseşte un număr de simboluri reprezentate de cele 4 nucleotide care intră în compoziţia acizilor nucleici. Secvenţa lor în lanţul de ADN determină şi secvenţa celor 20 de acizi aminaţi în lanţurile polipeptidice corespunzătoare. Fiecare acid aminat este codificat printr-un grup de trei baze azotate, iar cantitatea totală de informaţie genetică înscrisă în molecula de ADN a unui genotip reprezintă mesajul său genetic (fig. 1-27).

Scanned with OKEN Scanner

Codul monotipic (cu 4 combinații)	Codul cu dublete (cu 16 combinații)				Codul cu triplete (cu 64 combinații)			
A	AA	AG	AC	AU	AAA	AAG	AAC	A AU
G	GA	GG	GC	GU	AGA	AGG	AGC	AGU
U	CA	CG	CC	CU	ACA	ACG	ACC	ACU
C	UA	UG	UG	UU	AUA	AUG	AUC	AUU
					GAA	GAG	GAC	GAU
					GGA	GGG	GGC	GGU
					GCA	GCG	GCC	GCU
					GUA	GUG	GUC	GUU
					CAA	CAG	CAC	CAU
					CGA	CGG	CGC	CGU
					CCA	CCG	CCC	CCU
					CUA	CUG	CUC	CUU
					UAA	UAG	UAC	UAU
					UGA	UGG	UGC	UGU
					UCA	UCG	UCC	UCU
					UUA	UUG	UUC	UUU

Fig. 1-27. Reprezentare ipotetică a codificării prin 4, 16 și 64 simboluri.
Molecula de ADN conține 4 tipuri de baze azotate (adenina — A, timina — T, guanina — G și citozina — C), iar în citoplasma celulelor se găsesc 20 de acizi aminați (raport 1 : 5). Codificarea acestora de către cele 4 nucleotide ar putea simboliza 4 acizi aminați; codificarea prin combinarea a două nucleotide ar permite simbolizarea a 16 acizi aminați (insuficient pentru simbolizarea celor 20), iar codificarea prin combinarea a trei nucleotide depășește cu 44 simboluri necesarul de codificare a celor 20 de acizi aminați.

Scanned with OKEN Scanner

Tripleta de nucleotide care semnifică în mesajul genetic un acid aminat se numeşte *codon*. Codonii sînt identici pentru toate vieţuitoarele, după cum şi acizii aminaţi sînt identici; aceleaşi triplete corespund aceloraşi acizi aminaţi la virusuri, bacterii, plante, vertebrate şi om, ceea ce arată unitatea materiei vii, care are la bază aceeaşi structură şi aceleaşi legi genetice.

Codul genetic (care a fost recent descifrat în totalitate), reprezintă „lista" corespondenţelor de semnificaţie între tripletele nucleotidice şi acizii aminaţi. Sistemul de cod triplet permite ca o succesiune aparent dezordonată de 4 nucleotide să conţină totalitatea modelelor după care se sintetizează proteinele din organism, după cum şi cele două semne (punctul şi linia) din alfabetul Morse, pot reda 26 de litere ale alfabetului şi prin ele, orice fel de text. La fel cum înlocuirea unui semn în acest alfabet poate schimba o literă prin alta, iar mai departe înţelesul cuvîntului sau al frazei, tot astfel înlocuirea unui nucleotid în codon poate duce la schimbarea unui acid aminat prin altul cu consecinţe funcţionale mai mult sau mai puţin importante asupra proteinei sintetizate.

Excesul de triplete este folosit pentru a exprima, prin mai multe „sinonime", unul şi acelaşi acid aminat, sau reprezintă „codoni non sens" (tabelul 1-1). Unii din aceştia au rolul de a întrerupe „citirea" mesajului genetic, echivalînd cu punctul de la sfîrşitul unei fraze; s-a stabilit astfel că „punctul" poate fi reprezentat prin tripletele: U A A, U A G (codoni „stop"), iar codonul U G A separă genele în cadrul unui mesaj policistronic.

Tabelul 1-1

Corespondenţa dintre aminoacizi şi codonii de ARN-m
(A = adenină, C = citozină, G = guanină, U = uracil)

Aminoacizi	Codoni					
1. Serina	UCU,	UCC,	UCA,	UCG,	AGU,	AGC
2. Leucina	CUU,	CUC,	CUA,	CUG,	UUA,	UUG
3. Arginina	CGU,	CGC,	CGA,	CGG,	AGA,	AGG
4. Glicocolul	GGU,	GGC,	CGA,	GGG		
5. Alanina	GCU,	GCC,	GCA,	GCG		
6. Treonina	ACU,	ACC,	ACA,	ACG		
7. Prolina	CCU,	CCC,	CCA,	CCG		
8. Valina	GUU,	GUC,	GUA			
9. Izoleucina	AUU,	AUC,	AUA			
10. Cisteina	UGU,	UGC				
11. Metionina	AUG,	GUG				
12. Fenil-alanina	UUC,	UUU				
13. Tirozina	UAU,	UAC				
14. Acidul aspartic	GAU,	GAC				
15. Asparagina	AAU,	AAC				
16. Acidul glutamic	GAA,	GAG				
17. Glutamina	CAA,	CAG				
18. Histidina	CAU,	CAG				
19. Lizina	AAA,	AAG				
20. Triptofanul	UGG					

Codoni „non sens" care încheie lanţul polipeptidic: UAA, UAG, UGA.

Scanned with OKEN Scanner

Se va arăta în capitolele următoare care sînt consecințele metabolice ale substituirilor de acizi aminați și influența proprietăților unui acid aminat, a poziției lui în configurația moleculei asupra calităților metabolice ale proteinei respective (fig. 1-28).

e. **Recepționarea și traducerea mesajului genetic**

1) *Ribozomii.* Aparatul la nivelul căruia are loc descifrarea mesajului genetic și transpunerea în lanț polipeptidic este reprezentat de

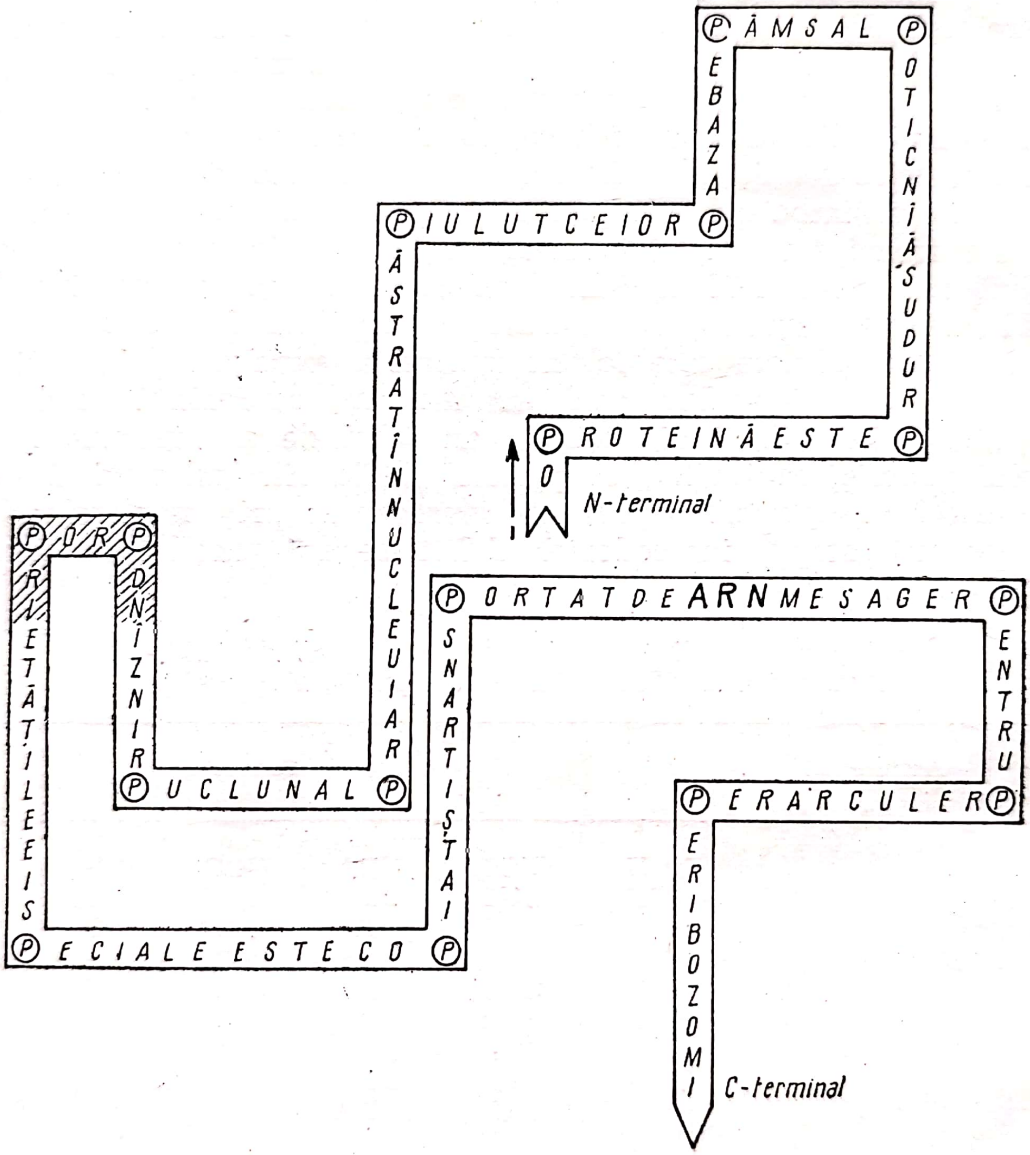


Fig. 1-28. Reprezentare simbolică a unei proteine (lanț polipeptidic) și a structurii sale spațiale (modificat și adaptat după Bresch-Hausman, 1970).

Proteina corespunde unui polinucleotid de ARN-m care a copiat modelul ei de pe ADN, transportîndu-l la locul de sinteză (ribozom). Literele simbolizează nucleotidele, iar cuvintele, codonii; sensul cuvintelor în frază simbolizează secvența acizilor aminați. Mesajul nu conține nici punctuație, nici spații între cuvinte; primul și ultimul codon (coada și vîrful săgeții) sînt codoni fără sens, care limitează un mesaj de altul. Primul cuvînt aparține capătului N terminal, iar ultimul capătului C terminal. La fiecare îndoire (curbă) a lanțului se găsește prolina (P) care este un acid aminat „flexibil", ce permite ca structura secundară a lanțului să apară liniar, nu numai în spirală. Porțiunea hașurată din lanț reprezintă centrul activ al proteinei. (A se citi mesajul în sensul săgeții.)

ribozomi. Ribozomii sînt particule inframicroscopice, descrise pentru prima oară în 1953 de către savantul american de origine română George Palade, laureat în 1974 al Premiului Nobel pentru medicină; ei sînt cunoscuţi şi sub denumirea de „granulele lui Palade". Ribozomii reprezintă în celulă sediul asamblării acizilor aminaţi în sinteza proteică. Proprietăţile lor se aseamănă în multe privinţe cu ale virusurilor sferice mici, care au dimensiuni şi compoziţie chimică asemănătoare.

Ribozomii se găsesc în citoplasma tuturor celulelor sub formă de granule rotunde sau ovale; uneori sînt dispuşi de-a lungul reticulului endoplasmic (foarte evident în celulele secretorii), iar alteori sînt difuz răspîndiţi în masa citoplasmatică (în eritroblaşti, reticulocite etc., unde proteina sintetizată rămîne intracelular).

Denumirea de ribozomi vine de la conţinutul lor ridicat (circa 60%) în acizi ribonucleici, fapt ce le conferă o bazofilie foarte intensă. Însăşi bazofilia citoplasmei este, în cea mai mare parte, determinată de prezenţa ribozomilor. Numărul lor în celulă este în raport direct cu intensitatea acestei sinteze.

Cu ajutorul coloraţiei negative (cu acid fosfotungstic) s-a constatat că ribozomii sînt formaţi din două părţi inegale ca formă şi mărime, separate de o constricţie care delimitează *subunităţile ribozomiale*. Subunitatea mare reprezintă circa 2/3, iar subunitatea mică, restul de 1/3 din ansamblul ribozomial.

Funcţia principală a ribozomilor este legată de sinteza de proteine după „reţeta" copiată de ARN-mesager. După trecerea sa în citoplasmă, lanţul de ARN-m se etalează pe subunitatea mică a subunităţilor ribozomiale, după ce a avut loc

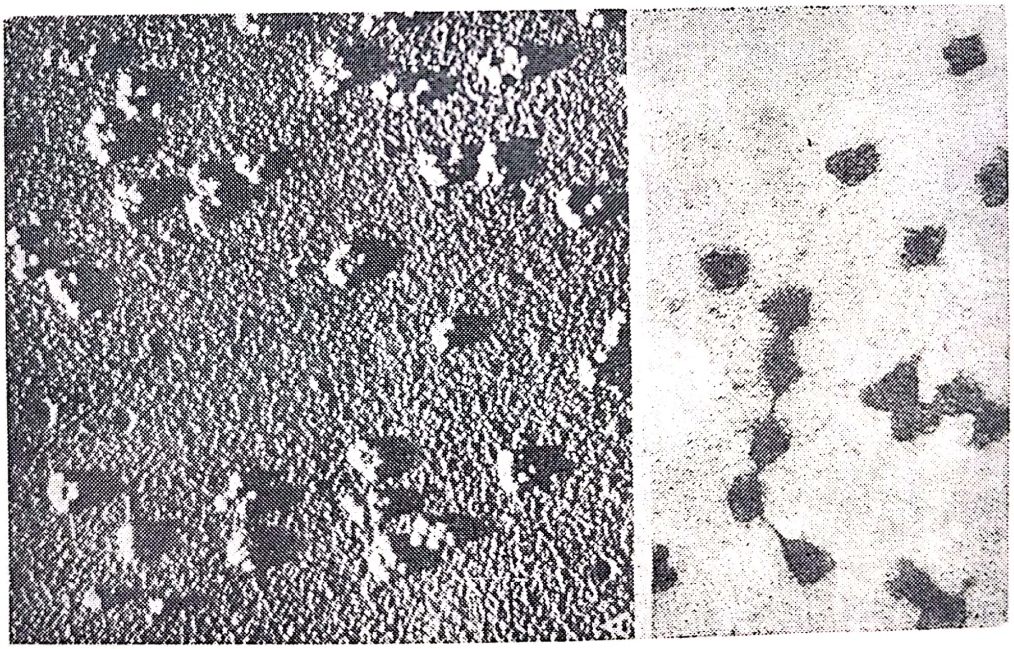


Fig. 1-29. Imagini electronomicroscopice ale unor mănunchiuri şi a unui şirag de poliribozomi formatori de hemoglobină, uniţi printr-un filament de ARN-m, într-un reticulocit (după A. Rich, 1962).
(Mărire de 90 000 ×, respectiv de 27 000 ×).

asamblarea în şir a mai multor ribozomi al căror număr variază între 2 şi 50, în funcţie de lungimea lanţului de ARN-m. În cazul lanţurilor α sau β ale hemoglobinei, lungimea catenei de ARN-m este de circa 1 500 Å. Un lanţ globinic are circa 150 de acizi aminaţi ceea ce corespunde pe ARN-m cu tot atîţia codoni; fiecare codon măsoară circa 10 Å (3×3,4 Å×150), ceea ce corespunde unui număr de aproximativ 5 ribozomi pentru un lanţ globinic (fig. 1-29).

Scanned with OKEN Scanner

Aceste agregate sînt asocieri funcționale tranzitorii, care durează atîta timp cît ține sinteza proteinei, după care polizomii se desagregă. În timp ce ARN-m își încheie existența, ribozomii, care au o durată de viață mai lungă (14—24 de ore), vor putea fi din nou utilizați pentru alte sinteze de proteine. Ribozomii izolați sînt inactivi; ei devin funcționali numai prin intermediul ARN-m.

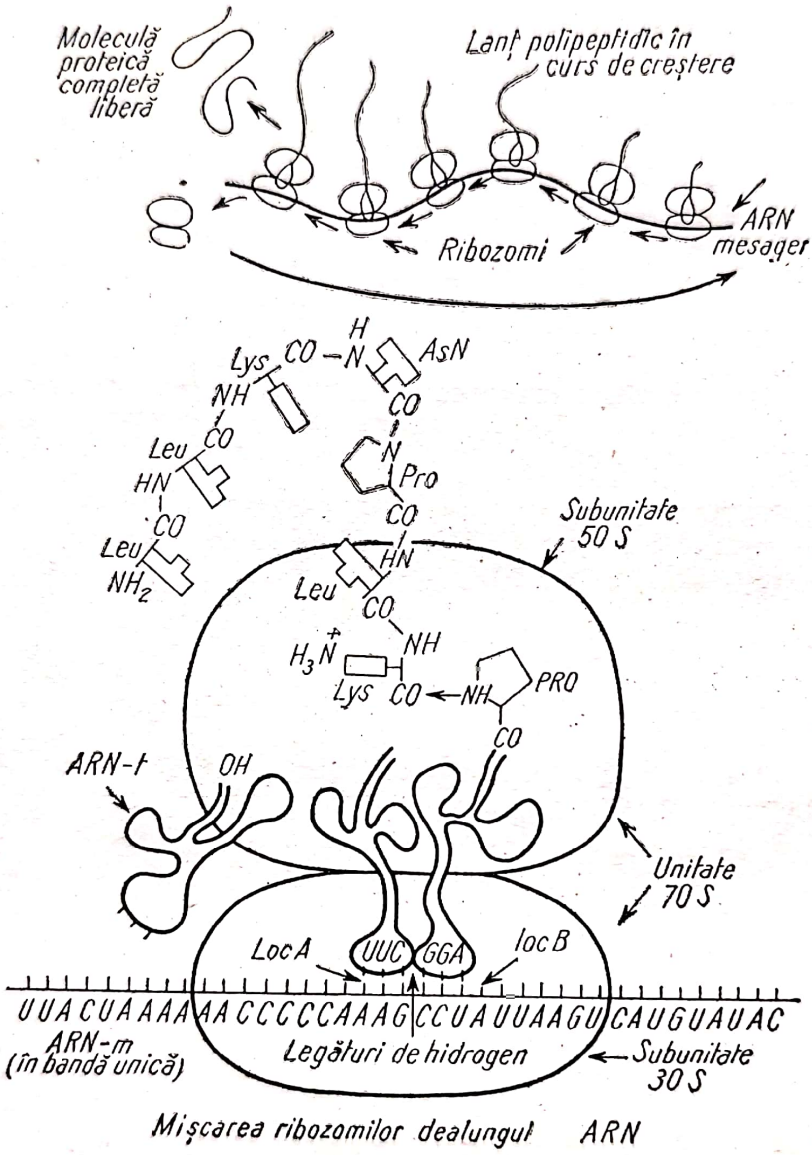


Fig. 1-30. Reprezentare figurată a modului de transcriere a mesajului genetic la nivelul ribozomului (modificat după Jukes).

Sus, sinteza de proteină într-un polizom. *Jos,* interacțiunea ARN-m/ARN-t într-un ribozom traversat de o fibră de ARN-m; este sugerat progresul sintezei lanțului proteic. Mesajul copiat de pe ADN este predat ribozomilor, unde este „tradus" în secvențe de acizi aminați (lanț polipeptidic). În stînga figurii se vede o moleculă de ARN de transfer, descărcată de acidul său aminat, pe cale de a fi eliberată din ribozom. Cele 39 nucleotide care se văd pe banda de ARN-m duc la sinteza unui polipeptid format din 13 acizi aminați (39 : 3). În cazul de față, lanțul polipeptidic a ajuns la un număr de 8 acizi aminați.

2) *Transcrierea informației genetice.* ARN-m care a copiat informația genetică „în negativ" ca o imagine în oglindă, o transmite mai departe în același fel; ea devine „pozitivă" abia după citirea complementară a mesajului ARN-m de către moleculele de ARN-t pe ribozomi, care realizează traducerea acestui cod din limbajul nucleic în limbajul proteic. Pe măsura progresiunii benzii de ARN-m de-a lungul polizomilor, lanțul polipeptidic se alungește prin adausuri succesive de acizi aminați. După transcriere lanțurile polipeptidice se separă de polizomi. Polizomii, pierzînd progresiv moleculele de ARN-t și lanțul de ARN-m se micșorează continuu pînă la dezintegrare (fig. 1-30).

În termeni informaționali se poate spune că sinteza proteinelor, comparată cu realizarea unui „proiect" tehnic, comportă următoarele elemente operaționale:

— *mesajul* codificat în „pozitiv" pe lanțul de ADN;

— *copierea* sau *transcrierea* în „negativ" a mesajului de către ARN-m pe baza legii complementarității nucleotidelor;

— *transmiterea* mesajului prin difuzarea ARN-m în citoplasmă și *recepționarea* lui pe ribozomi;

— *descifrarea* în „pozitiv" a mesajului de către ARN-t, tot pe baza complementarității (proces neenzimatic);

— *traducerea* lui (decodificarea) din secvență nucleotidică în secvență de acizi aminați (proces enzimatic) datorită dublei specificități a ARN-t (pentru o anumită „literă de cod" pentru un anumit acid aminat);

— *destinația* proteinei rezultate (rol structural sau funcțional în diferite procese metabolice).

d. **Legile mendeliene ale eredității.** Johann Gregor Mendel (1822—1884) a fost un călugăr ceh cu studii superioare de biologie la Universitatea din Viena, care s-a pasionat pentru experiențe de hibridare la plante. Lucrările lui au fost ignorate aproape jumătate de secol, pentru ca alți biologi, în mod independent, să le „redescopere" sub o formă sau alta. Într-o a doua etapă (mai recentă) lucrările lui Mendel au fost greșit interpretate și combătute, pentru ca astăzi ele să stea la temelia oricăror studii de genetică. Metodele folosite de el în urmă cu peste un secol sînt utilizate întocmai și astăzi, ca bază a cercetărilor moderne de genetică. În esență, metoda mendeliană constă în controlul încrucișărilor la viețuitoare simple, cu observarea modului de transmitere în generații a unor trăsături diferite ale aceluiași caracter. Datele acumulate la viețuitoarele simple au fost extrapolate apoi la cele superioare. Concluziile descoperirilor lui Mendel pot fi rezumate în următoarele două legi de bază, cea a segregării și cea a asortării independente.

Legea segregării (separării) caracterelor. La progenul hibrid elementele genetice care stau la baza a două forme deosebite de expresie ale unui caracter nu se amestecă indisolubil (de exemplu, ca două vopsele, una roșie și alta galbenă din care să rezulte o culoare portocalie), ci se alătură ca pietrele unui mozaic, fără a-și pierde individualitatea. Chiar dacă în prezența trăsăturii dominante trăsătura recesivă rămîne nemanifestă, ea nu dispare, ci circulă de-a lungul mai multor generații, ajungînd să se manifeste la indivizii la care nu mai apare

Scanned with OKEN Scanner

trăsătura dominantă. Astfel se explică reapariţia unor caractere aparţinînd unor strămoşi, dar care nu au fost vizibile la părinţii sau bunicii individului, dovedind că ele pot supravieţui indefinit amestecurilor succesive. Eliminarea completă prin „diluţie" a caracterelor transmise ereditar nu este deci posibilă prin încrucişare.

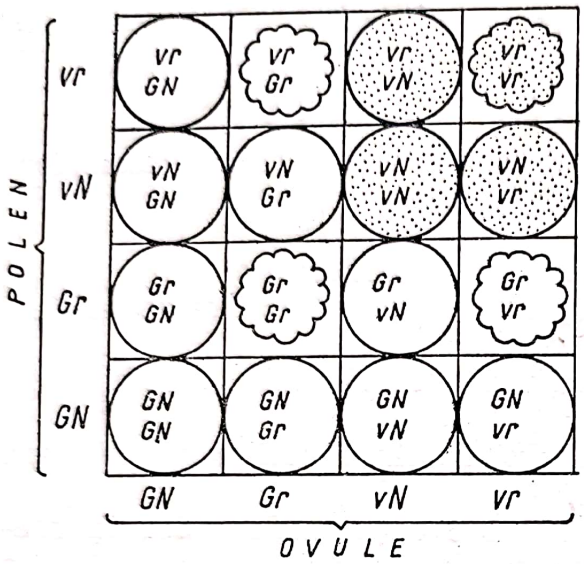


Fig. 1-31. Reprezentare schematică a asortării independente a caracterelor (vezi şi „Dominanţă şi recesivitate", pag. 62).

În acest exemplu elementar sînt figurate combinaţiile a două caractere prezente, în cîte două variante rezultate din amestecul caracterelor dominante ale mazărei galbene (G) şi netede (N), cu caracterele corespunzătoare recesive ale mazărei verzi (v) şi rugoase (r). Deşi combinarea între gene se face în proporţii egale, manifestarea celor 4 caractere apar fenotipic în proporţii diferite (în funcţie de dominanţă sau recesivitate). Astfel, din cele 16 combinaţii posibile, cele 2 caractere dominante (G şi N) apar împreună de 9 ori, fiecare din caracterele dominante apar combinate cu caracterul recesiv (nealelic) de cîte 3 ori (3 Gr+3 vN) şi numai o singură dată apare combinaţia celor două caractere recesive (vn), raport 9 : 3 : 3 : 1.

Legea asortării independente. Urmărind la progen două caractere diferite, Mendel a constatat că în cursul generaţiilor, trăsăturile acestor caractere se asortează independent de combinaţia în care s-au găsit la predecesori (fig. 1-31).

4. CONCEPTUL DE GENĂ ŞI EREDITATE CROMOZOMIALĂ

a. **Genă, genotip, fenotip.** Termenul de genă a fost creat de către farmacistul danez Johannsen în 1909. Morgan şi colab., prin experienţe efectuate între anii 1910 şi 1915 pe insecta *drosophila melanogaster*, au adus contribuţii importante la clarificarea concepţiilor în legătură cu cromozomii şi genele (137, 211, 214, 266, 297).

Gena este o unitate funcţională din lanţul polinucleotidic de ADN, un fragment din această moleculă, care conţine informaţia genetică necesară pentru sinteza unui lanţ polipeptidic. Fiecare cromozom cuprinde un număr constant de gene alcătuite dintr-un anumit număr de codoni înşiraţi linear de-a lungul lanţului de ADN într-o anumită ordine. Un virus conţine un număr de 5—6 gene, iar o bacterie dintre cele mai simple conţine cel puţin 3 000 de gene, pe cînd numărul de gene dintr-o celulă umană este de ordinul zecilor sau sutelor de mii (între 60 000 şi 1 000 000). Genomul bărbatului este cu 2—6% mai redus decît al femeii din cauza diferenţei de mărime dintre cromozomul X şi Y. Gena lanţului α a moleculei de hemoglobină, care are 141 de acizi aminaţi, este codificată în genă tot prin 141 de codoni, care însumează 423 de nucleotide.

Scanned with OKEN Scanner

Individualizarea genelor nu este posibilă morfologic; între ele există cel mult un codon „nonsens"; identificarea genelor se poate face prin produsul lor, de exemplu, prin cercetarea enzimei respective.

După Dobzhanski (1961), un cromozom nu este un container oarecare pentru gene, ci un sistem armonios de gene în interacțiune. Aranjamentul genelor într-un cromozom s-a dezvoltat gradat în cursul evoluției organismului căruia îi aparține; structura unui cromozom, asemenea structurii unui organ, este un produs al evoluției. Interacțiunea armonioasă sau nearmonioasă a genelor este tradusă funcțional prin expresia fenotipică exprimată, în esență, prin sinteză de proteine.

După cum s-a mai arătat fiecare individ posedă două seturi de cromozomi somatici sau autozomi, iar perechea 23 o formează cromozomii sexuali (x și y sau heterozomii). Deoarece cromozomii se află în pereche în celulele somatice, genele sînt și ele în dublu exemplar. După J. M. Robert (1974) fiecare proteină structurală care ne face să fim ceea ce sîntem și fiecare enzimă răspunzătoare de o anumită verigă metabolică sînt sintetizate, de la naștere pînă la moarte, sub controlul celor două gene, una paternă și alta maternă, a cărui cuplu figurează în două poziții simetrice pe o pereche de cromozomi omologi.

Genele ocupă totdeauna aceeași poziție în cromozomi denumită „locus". Genele care ocupă loci corespunzători omologi se numesc *alele* (cuv. gr. *allelon*=de la unul la altul). Alelele pot fi identice sau diferite; alelele diferite pot fi normale sau patologice.

*Cistronul** este un segment cromozomial mai mic decît gena, reprezentînd totuși o unitate funcțională (subunitate de genă). Adesea, atît cistronul, cît și gena, se suprapun ca unitate funcțională. Astfel, formula veche a lui Beadle și Tatum (1941) „o genă=o enzimă", tinde să fie înlocuită cu aforismul mai precis „un cistron=un lanț polipeptidic".

Genomul reprezintă totalitatea materialului genetic conținut într-un set cromozomial haploid din spermatozoid sau din ovul — la om 23 de cromozomi — zestrea genetică pe care o transmite zigotului unul din cei doi parteneri sexuali. Celulele somatice diploide au doi genomi, proveniți fiecare de la unul din parentali.

Genotipul sau baza ereditară, reprezintă totalitatea materialului genetic conținut în cromozomi. La organismele diploide genotipul cuprinde materialul genetic din ambii genomi (matern și patern). Datorită sintezei replicative a ADN, genotipul tuturor celulelor somatice este identic cu al celulei inițiale (zigotul). De la zigot, genotipul se transmite miliardelor de celule descendente, indiferent de diferențierea pe care o va suferi ulterior, majoritatea genelor din genotip fiind, bine înțeles, în stare represată.

Fenotipul reprezintă suma potențialităților biochimice ale unui organism, care se traduce printr-un complex de trăsături constatabile. Întru-

---

* Cuvînt latin *cis*=dincoace, opus față de *trans*=dincolo. Efectul cis se referă la cazul în care manifestarea fenotipică a anumitor forme ale unor gene aproape depinde de poziția lor pe același cromozom (poziție cis) sau pe cîte unul din cromozomii omologi (poziție trans).

Scanned with OKEN Scanner

cît din totalitatea caracterelor înscrise în genotip, numai o parte poate ajunge să se manifeste, se poate spune că fenotipul este partea exprimată a genotipului. În timp ce genotipul este invariabil, începînd din stadiul de zigot pînă la moartea individului, fenotipul se poate schimba pe parcursul existenței individuale sub dependența mecanismelor reglatoare ale expresiei genice și în legătură cu factorii de mediu.

b. **Homo-, hetero- și hemizigot.** Sub termenul de *homozigot* se înțelege condiția în care un progen moștenește aceeași alelă (normală sau patologică) de la ambii părinți. *Heterozigot* este individul care moștenește de la parentali alele diferite, corespunzînd caracterului respectiv. În patologie se folosește și expresia de *heterozigot dublu* pentru situațiile în care progenul moștenește cîte o alelă patologică pentru două caractere diferite (cîte una de la fiecare parental, sau ambele de la unul din parentali). *Hemizigot* este individul (bărbat) care are o alelă patologică pe unul din cromozomii sexuali (X sau Y); din lipsa alelei compensatoare, această alelă va avea totdeauna expresie fenotipică, ca la un homozigot veritabil, indiferent dacă alela rezultată are caracter dominant sau recesiv (de exemplu, deficitul enzimei glucozo-6-fosfat dehidrogenaza favismul, hemofilia etc.).

În figura 1-32 sînt redate cele mai reprezentative modalități de transmitere a tarei cînd mutația este localizată pe unul din cromozomii somatici. În fig. 1-33 sînt redate modalitățile de transmitere a tarei cînd aceasta este localizată pe unul din cromozomii sexuali X.

c. **Dominanță și recesivitate.** Dominanța este calitatea pe care o posedă una din formele alelice de a se manifesta în detrimentul sau avantajul unei alte trăsături (alele) ale aceluiași caracter. Efectul fenotipic puternic este *dominant,* iar cel neexprimat, (dar totuși prezent genetic), se numește *recesiv.*

În cazul unor alele identice (homozigotism), ambele locusuri genice colaborează la formarea de ARN-m pentru sinteza proteinei, prin care caracterul respectiv se manifestă fenotipic. În cazul unor alele diferite (heterozigotism), alela dominantă este angajată exclusiv sau predominant în expresia fenotipică, excluzînd (total sau parțial) alela recesivă. Cu alte cuvinte, caracterul dominant se exprimă fenotipic chiar și în doză simplă; este suficient să-l posede unul din părinți pe alela transmițătoare pentru ca starea de sănătate sau de boală să aibă o expresie completă (de exemplu sferocitoza ereditară unde formele homozigote nu sînt viabile). Caracterul recesiv se exprimă fenotipic numai în doză dublă, tara trebuind să existe la ambii părinți, de exemplu protoporfiria eritropoietică. Simbolic, o trăsătură (alelă) dominantă se notează cu o majusculă (A, B, C etc.), iar alela recisivă cu litera mică corespunzătoare (a, b, c etc.). Tot în legătură cu exprimarea fenotipică, în condiția heterozigotă, alelele pot fi *codominante* cînd au o penetranță aproximativ egală, de exemplu 50 : 50% sau 60 : 40% (β^N—β^S); astfel alela Hb S (β^S) este codominantă față de alela normală Hb A. În forma heterozigotă (Hb A—S) boala nu este complet exprimată clinic; pentru o simptomatologie com-

Scanned with OKEN Scanner

pletă (anemie severă cu siclizare, tromboză etc.) este necesară forma homozigotă (Hb S—S); în realitate fenotipul heterozigot este un intermediar între fenotipul homozigot și cel sănătos, fără să fie necesară o poziție strict de „mijloc".

Transmiterea autosomală a unui caracter se face prin gene situate pe cromozomi somatici (alții decît X și Y).

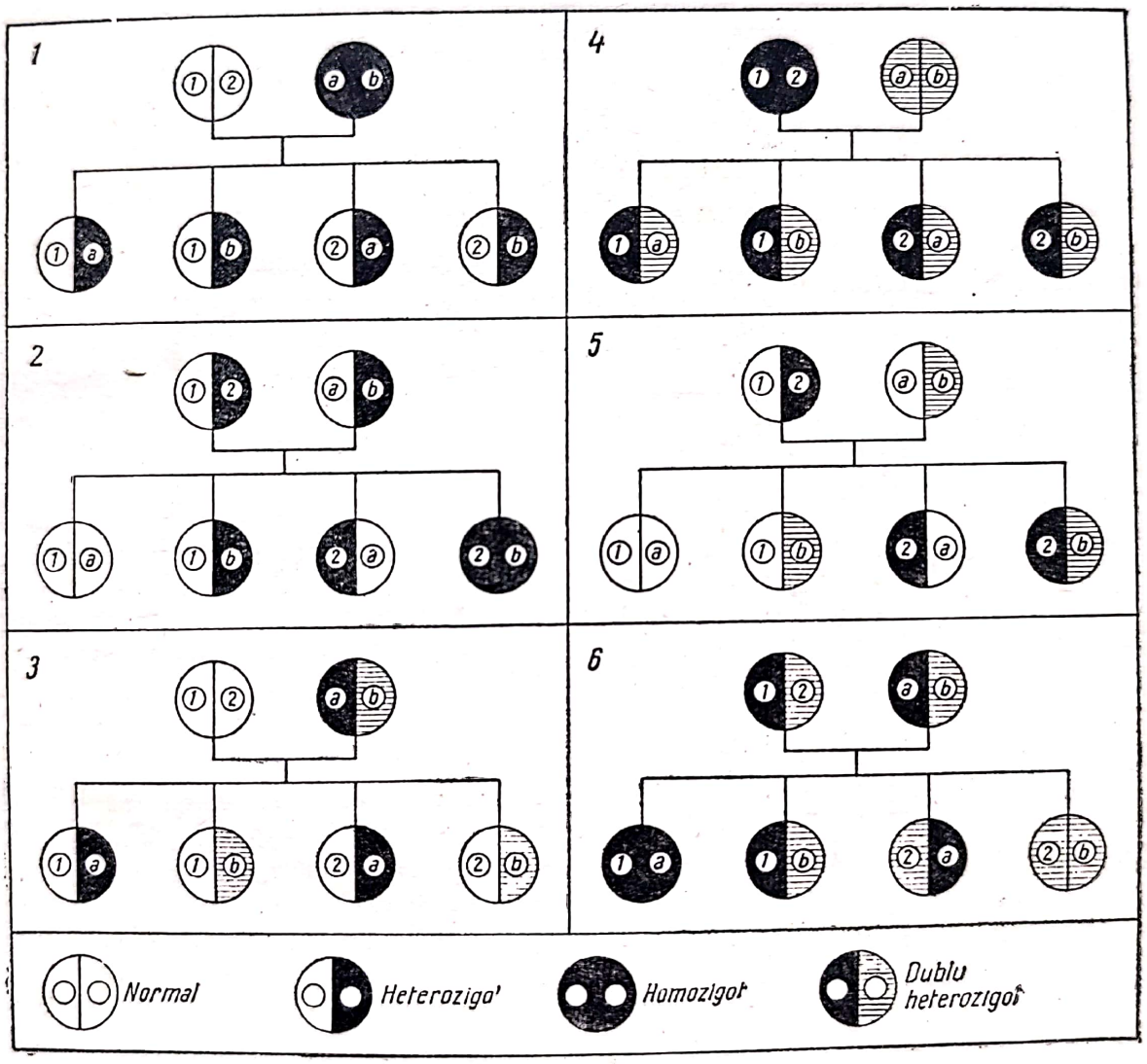


Fig. 1-32. Reprezentare schematică a principalelor modalități de transmitere a tarelor ereditare localizate pe cromozomi nesexuali (autozomi).

Fiecare parental transmite progenului un set de cromozomi din cele două seturi omologe (aici 1 sau 2 și a sau b). Erorile ereditare pot fi localizate pe una, două, trei sau pe toate cele patru seturi. 1. Dacă unul din părinți este normal iar altul homozigot, toți copiii vor fi heterozigoți. 2. Dacă ambii părinți sînt heterozigoți pentru aceeași tară, copiii vor fi normali în proporție de 25%, hemozigoți 25% și heterozigoți 50%. 3. Dacă unul din părinți este normal, iar altul este dublu heterozigot, toți copiii vor fi simplu heterozigoți, 50% pentru una din tare și 50% pentru alta. 4. Dacă ambii părinți sînt homozigoți pentru tare diferite, toți copiii vor fi dublu heterozigoți. 5. Dacă părinții sînt heterozigoți pentru tare diferite, copiii vor fi normali în proporție de 25%, simplu heterozigoți pentru una din tare (25+25%) sau dublu heterozigoți (25%). 6. Dacă ambii părinți sînt dublu heterozigoți copiii vor fi homozigoți în proporție de 25%, pentru una din boli și 25% pentru alta, iar 50% dublu heterozigoți.

Transmiterea legată de sex reprezintă situațiile în care caracterele, (normale sau patologice) sînt determinate de genele localizate pe heterozomi (X sau Y).

Modificarea expresiei unei gene. Nu totdeauna manifestarea unei gene patologice este influențată numai de alela ei normală, ci și de alți loci genetici și chiar de unii factori de mediu. *Expresivitatea* și *penetranța*

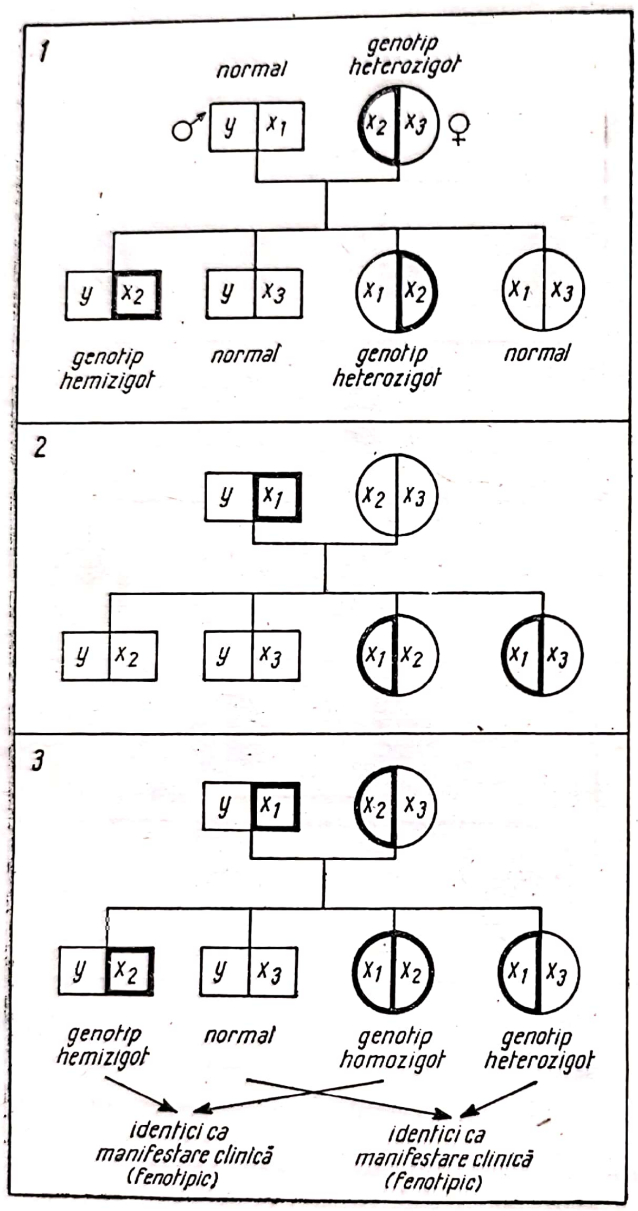


Fig. 1-33. Modalități de transmitere genetică a tarei cînd aceasta este localizată pe un heterozom X.

Din schemă rezultă următorul mod de transmitere: 1. O femeie purtătoare transmite tara la jumătate din copiii ei, indiferent de sex; băieții purtători vor fi *hemizigoți,* cu atipia complet exprimată fenotipic (comportament ca și de homozigot), iar fetele vor fi *heterozigote,* însă nu în sensul cromozomilor autozomali, ci aparent sănătoase din cauza cromozomului X compensator. (În realitate femeile sînt „mozaicate", întrucît în unele celule din țesuturi se sintetizează enzima normală, iar în altele, variantele patologice. 2. Un bărbat purtător (fenotipic manifest) transmite tara tuturor fiicelor (genotipic tarate), care însă nu vor avea manifestări morbide (fenotipic sănătoase); băieții nu vor poseda tara deoarece moștenesc de la tată numai cromozomul Y). 3. Cînd ambii părinți sînt purtători de tară, jumătate din băieți vor fi *hemizigoți* (bolnavi), iar fetele vor fi purtătoare; din acestea, jumătate vor fi „homozigote" (bolnave) și jumătate *heterozigote* (fenotipic sănătoase).

unei gene sînt manifestări variabile ale unei gene normale sau purtătoare de tară la un individ din același arbore genealogic. De exemplu, talasemia homo- sau heterozigotă, manifestările deficitului de G-6-PD etc.) (tare localizate pe cromozomul sexual X), pot să prezinte o gamă largă de intensități în cadrul aceleeași fratrii (între „1" și 100%), în funcție de gradul de „penetranță" a tarei.

Pleiotropismul unor gene reprezintă intervenţia lor în determinarea mai multor trăsături fenotipice datorită, de exemplu, participării enzimei respective în mai multe căi metabolice (cuv. gr. *pleios*=mai mult). *Determinismul poligenic* al unor caractere ţine, de exemplu, de faptul că ele rezultă dintr-un lanţ de procese metabolice în care intervin mai multe enzime, determinate de tot atîtea gene.

d. **Recombinarea materialului genetic.** Între indivizii unei specii mai evoluate există (cu excepţia gemenilor univitelini), atît de numeroase deosebiri genotipice şi fenotipice, încît fiecare individ reprezintă un unicat care nu a mai existat, nu mai există şi nu se va repeta identic vreodată. Această diversitate se datoreşte numărului enorm de posibilităţi de recombinare a fondului de gene (258).

1) *Modalităţi de recombinare genetică.* Fenomenul de recombinare genetică se realizează pe următoarele căi:

a) *Distribuirea (disjuncţia) independentă a perechilor de cromozomi.* În cursul primei diviziuni meiotice cromozomii din cele două seturi moştenite de la părinţii progenului se distribuie la întîmplare în unicat între cele două celule haploide rezultate de ex. a, b, 3, d, 5, 6, 7, h etc.). Astfel, seturile cromozomiale ale unui gamet vor conţine un număr variabil (între 0 şi 23) de cromozomi proveniţi de la unul din cei doi bunici ai mamei sau ai tatălui (notaţi aici, unii cu litere, alţii cu cifre). Fenomenul de „opţiune" a cromozomilor omologi pentru unul sau altul din seturi, urmat de împerecherea lor în zigot (noul progen) a fost numit de J. H. Müller „dansul cromozomilor". Numărul de combinaţii posibile creşte exponenţial cu numărul de perechi cromozomiale. La om, numai din combinarea diferită a celor 23 de perechi de cromozomi dintr-un set pot rezulta 8 338 608 tipuri diferite de spermatozoizi sau ovule (vezi şi meioza, pag. 38).

b) *Recombinarea genelor între cromozomii pereche* (sau *crossing over*) reprezintă procesul de schimb reciproc de material genetic pe întinderi diferite, între cromozomii omologi, cu ocazia încrucişării cromatidelor alăturate în cursul meiozei, prin ruperea unor segmente cromatidice şi alipirea lor la cromozomul controlateral. Astfel, dacă un segment de cromozom omolog poartă genele A B C D, iar celălalt genele a b c d, încrucişarea reciprocă între cele două segmente va duce la formarea unor grupuri ligaturale noi, de exemplu A B c d şi a b C D sau alte combinaţii. Această modalitate de recombinare a materialului genetic măreşte şi mai mult numărul mare de variante rezultate din asortarea întîmplătoare a cromozomilor în meioză. Crossing over-ul este un fenomen întîmplător, care poate avea loc, probabil, în orice punct al cromozomului. Cu cît genele sînt mai apropiate unele de altele în acelaşi cromozom, cu atît şansa lor de separare în cadrul schimbului de segmente este mai redusă şi invers. Din punct de vedere statistic unele regiuni sînt mai expuse la fenomenul de crossing-over decît altele. În legătură cu nivelul la care are loc fenomenul de crossing-over, el poate avea loc nu numai între gene şi între subunităţile acestora (cistroni), recombinările putînd merge chiar pînă la schimburi intracodonice.

Scanned with OKEN Scanner

2) *Grupul ligatural și cartografierea genetică.* *Grupul ligatural („linkage group")* reprezintă totalitatea genelor, mai mult sau mai puțin apropiate spațial care segregă împreună. În ultimă instanță, însuși cromozomul reprezintă un astfel de grup ligatural. *Cartografierea genetică* sau hărțile cromozomiale consemnează ordinea spațială a locilor pe care se găsesc genele unui organism (95). Distanța dintre două gene pe lanțul de ADN din cromozomi este invariabilă. La unele viețuitoare protocariote care au un singur cromozom (alcătuite dintr-un singur lanț neîntrerupt de ADN) s-a determinat distanța între diferiți *markeri* (caractere evidente, expresie a unei anumite gene). La unii bacteriofagi s-a putut merge cu cartografierea pînă la ultima limită posibilă a descifrării genice: baza moleculară a segmentelor de gene. La organismele eucariote (cu mai mulți cromozomi), realizările în această direcție sînt mai modeste. Progrese mai importante au fost obținute, deocamdată, doar prin cunoașterea unor gene lincate (189) (fig. 1-34). Distanțele genetice se exprimă în *unități de recombinare* sau unități Morgan, denumite și morganide.

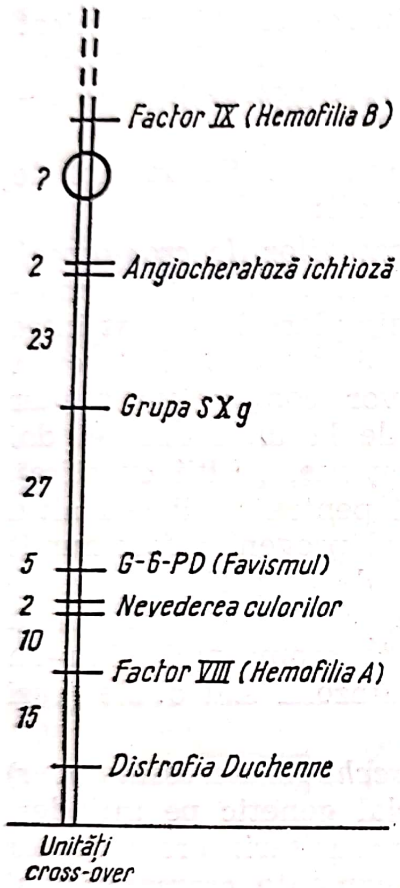


Fig. 1-34. Cartografiere ipotetică a locus-urilor caracterelor pe cromozomul X la om (după Davidson, 1967).

Pentru eritrocit, de importanță deosebită este localizarea pe acest cromozom a informației genetice pentru enzima glucozo-6-fosfat-dehidrogenază.

e. **Controlul biosintezei proteinelor (reglarea genetică).** În cursul activității celulare este utilizată doar o infimă parte din informația genetică conținută în nucleu, aceea care corespunde necesităților etapei de dezvoltare a tipului celular și a fazei funcționale a celulei, cea mai mare parte a genelor eucariotelor fiind în stare represată (inactivă). Astfel, deși genele de sinteză ale proteinei hemoglobinei există în toate celulele din organism, ele nu funcționează decît în eritroblești, după cum insulina nu se sintetizează decît în celulele β din insulele Langerhans ale pancreasului.

1) *Gene structurale și gene reglatoare.* O contribuție de bază în explicarea modului de funcționare al genelor au adus-o savanții francezi Jacob și Monod (1961). Intrarea și ieșirea din funcție a genelor (reglare genetică), se face printr-un mecanism de inducție-represie (158 a, 182). Genele structurale comandă secvența acizilor aminați care alcătuiesc o anumită proteină (gene calitative); acestea sînt gene producătoare. În afara lor există și alte gene care comandă cantitatea și ritmul sintezei proteice, cu alte cuvinte, se determină foarte exact momentul și cantitatea la care trebuie sintetizată fiecare proteină într-un anumit moment metabolic celular, în funcție de necesi-

Scanned with OKEN Scanner

tăţile globale, integrînd funcţia aparatului genetic în funcţionalitatea generală a organismului. Aceste gene, numite *gene reglatoare* sau de aranjament intervin asupra genelor de structură pe care le represează prin intermediul unui produs polipeptidic al genei reglatoare numit *represor*. Acesta nu acţionează direct asupra genelor de structură; se presupune că în partea iniţială a grupului genelor de structură există un segment genic numit *operator* care reacţionează cu represorul. Operatorul este punctul fix în care se iniţiază biosinteza replicativă a moleculei de ARN-m pe matricea de ADN pentru genele structurale din unitatea ce cooperează la sinteza unei proteine. Întregul grup format din operator şi din genele structurale, pe care operatorul le controlează, se numeşte *operon*. O modificare structurală (prin mutaţie) a operatorului

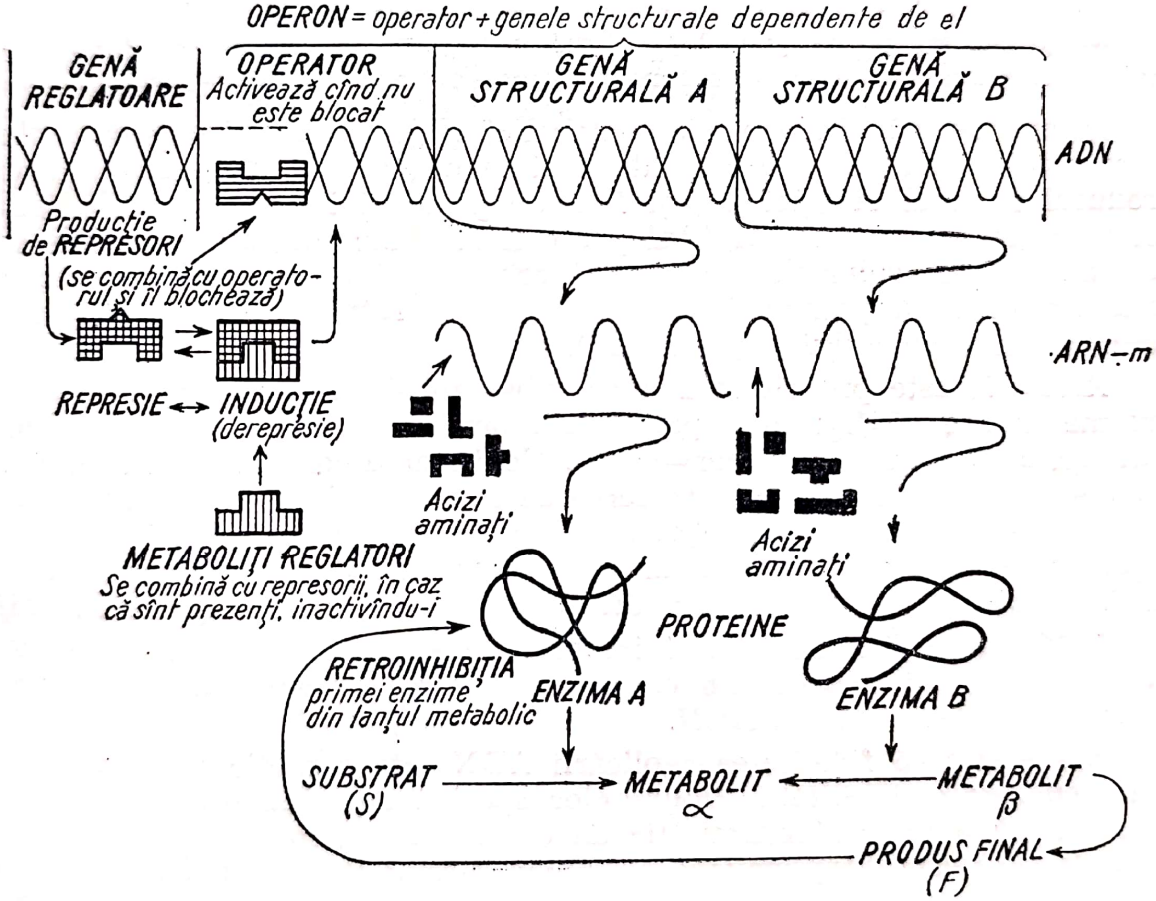
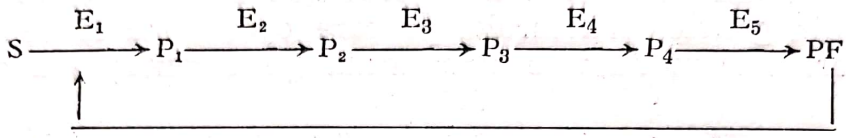


Fig. 1-35. Reprezentare schematică a intrării şi ieşirii din funcţie a genelor care comandă biosinteza proteinelor, după ipoteza lui Jacob şi Monod. (Modificat după D. E. Green şi R. F. Goldberger, 1967).

Un substrat S este transformat, prin acţiunea unor enzime, într-un produs terminal F, după ce a parcurs un lanţ de transformări intermediare (α, β etc.) induse de enzimele corespunzătoare (A, B etc.). Structura acestor enzime este determinată de genele de structură A, B etc. care sînt puse în funcţiune de o *genă operatoare*. Genele de structură, împreună cu operatorul, formează o unitate funcţională numită *operon*. Producţia cantitativă a operonului este dirijată de o genă reglatoare prin intermediul *represorului* (o proteină determinată de această genă care inhibă activitatea întregului operon). Dintre substanţele ajunse în mediul celular, unele pot avea acţiune de corepresori, iar altele de inductori, după cum accentuează sau slăbesc acţiunea represorului. În afară de această reglare pe cale genetică a sintezei de proteină, există şi o reglare prin inhibarea (retroinhibiţia) activităţii primei enzime din lanţ (A) de către produsul final (PF) (inhibiţie prin *feed-back*).

poate duce, fie la suprimarea operonului, fie din contra, la o sinteză necontrolată de cantități foarte mari din proteina respectivă, cu consecințe asupra căii metabolice (fig. 1-35).

2) *Retroinhibiția și fenomenul alosteric.* Produsul final al unei reacții poate să asigure reglarea unei întregi secvențe, fenomen numit *retroinhibiție* sau *inhibiție prin produs final,* descris de Novick și Szilard în 1964, cunoscut și sub numele de *feed-back* (69 a). El poate fi redat prin următoarea schemă reprezentată de un lanț de reacții enzimatice:



în care E_1, E_2, E_3, E_4, E_5 sînt enzime, S=substrat, P_1, P_2, P_3, P_4=produși intermediari rezultați din acțiunea enzimelor corespunzătoare, iar PF=produsul final.

Prima enzimă din secvența metabolică (E_1), numită și *enzimă reglatoare* este dotată cu o reactivitate particulară; ea este sensibilă față de produsul final al reacției, nu și față de produșii intermediari. În felul acesta obținerea produsului final poate fi inhibată împreună cu întregul lanț de sinteză, chiar de către acest compus, cînd cantitatea lui depășește limita utilă pentru celulă. Mecanismul retroinhibiției a putut fi lămurit grație efectului alosteric (23).

Alosteria este proprietatea unor substanțe de a se prezenta cu două sau mai multe configurații spațiale a atomilor care alcătuiesc molecula (cuv. gr. *allos*=altul și *stereos*=solid). Modificarea configurației tridimensionale a moleculei constă în trecerea de la starea de „contracție" la starea „relaxată" (fig. 1-36). Aceste concepții asupra efectului alosteric explică specificitatea interacțiunii moleculare a enzimelor cu substratul, ea fiind bazată pe schimbarea arhitecturii moleculei de proteină (23).

f. **Mutațiile** sînt modificări ireversibile și stabile apărute în structura materialului genetic din cromozomi, avînd ca rezultat modificarea secvenței nucleotidice din ADN.

S-a arătat că fidelitatea replicării ADN este condiția necesară pentru menținerea stabilității caracterelor speciei. Apariția într-o proporție foarte mică a unor „inexactități" de copiere duce, în majoritatea cazurilor, la un dezavantaj biologic al celulei, urmat de moartea ei sau la o inferioritate biologică. În unele cazuri mutația reprezintă un avantaj biologic față de genotipul originar. O dată apărută, o mutație se păstrează de-a lungul generațiilor. Mutațiile „avantajoase" au stat la baza evoluției speciilor prin selecție naturală, ieșind învingătoare acele viețuitoare care au fost capabile să sintetizeze proteinele ce le-au conferit un avantaj selectiv, de exemplu putere fizică suplimentară, iar pentru viețuitoarele superioare din regnul animal, un plus de inteligență.

Gradul de exactitate a transcrierii codului genetic este foarte ridicat; o eroare de înlocuire a unei baze cu alta apare la 100 de milioane pînă la 1 miliard de transcripții, însă frecvența lor poate fi mult crescută

Scanned with OKEN Scanner

prin intervenţia anumitor agenţi mutageni. Nu toate erorile de transcriere duc la modificări funcţionale. De obicei mutaţiile se produc prin modificarea unei singure baze de codon. Teoretic sînt posibile 549 de substituiri însă 2/3 din acestea codifică acelaşi acid aminat exprimat prin alt sinonim (cod degenerat). În felul acesta doar 134 de substituiri ar reprezenta modificări reale ale codului genetic. Teoretic, toate genele pot suferi mutaţii.

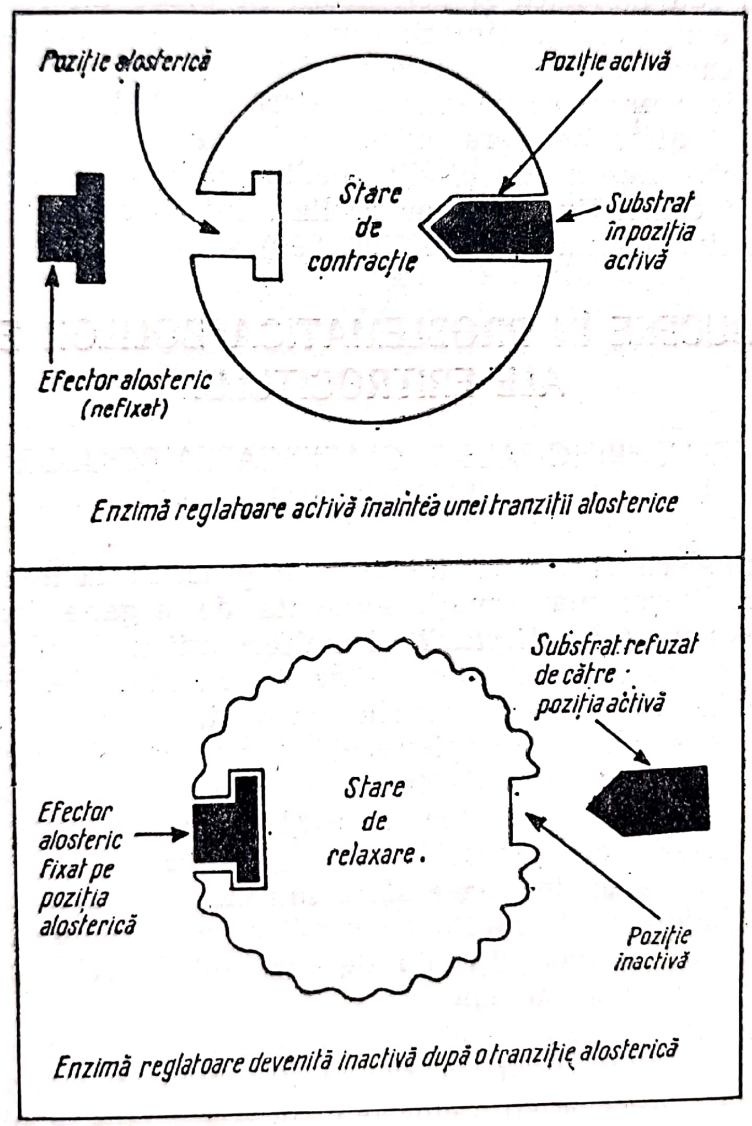


Fig. 1-36. Schema unei tranziţii alosterice (după P. Louisot, 1969; 68).

O enzimă reglatoare are două faze principale: *o fază activă*, stadiul catalizei enzimatice pentru care este adaptată şi *o fază alosterică*, constînd dintr-o anumită conformaţie spaţială la care este adaptat efectorul alosteric. Combinarea efectorului alosteric cu zona alosterică creează o modificare a conformaţiei spaţiale a proteinei enzime şi, concomitent, o modificare a fazei (zonei) active, ceea ce duce la pierderea capacităţii de adaptare la substrat şi, în consecinţă, la scăderea sau abolirea activităţii biologice.

Scanned with OKEN Scanner

După afirmația lui A. E. Garrod, „erorile înnăscute ale metabolismului sînt exemple extreme ale modificării comportamentului chimic al organismului"; astfel, pentru ca o mutație să se exprime ca o boală moleculară este necesar să depășească o anumită limită a proceselor metabolice deviate. Numai în aceste condiții modificările genotipice duc la schimbări în expresia fenotipică a individului, în caz contrar mutația poate rămîne mută și nedescoperită. Mutațiile apar sub acțiunea unor factori de mediu mutageni intrinseci sau extrinseci care pot fi de natură fizică, chimică sau biologică și acționează în etape diferite ale ciclului mitotic (fază de repaus, de sinteză sau de mitoză propriu-zisă) Agenții mutageni sînt capabili să interfereze desfășurarea normală a precursorilor care alcătuiesc procesul de sinteză ADN alterînd configurația mesajului genetic. În afara acestora există mulți alții, dintre care unii sînt încă neidentificați. Se susține că din mediul ambiant ar acționa acumulări persistente cantitative care ar realiza, într-o anumită perioadă de timp, salturi calitative mutaționale (209, 299).

B. INTRODUCERE ÎN PROBLEMATICA BOLILOR EREDITARE ALE ERITROCITULUI

1. CARACTERELE PRINCIPALE ȘI CLASIFICAREA BOLILOR EREDITARE ERITROCITARE

Medicul modern descoperă frecvent în practica sa numeroase tipuri de defecte ereditare: malformații evidente de organe (*morfodisplazii*), malformații tisulare *(histodisplazii)* și malformații moleculare *(chimiodisplazii*), ultimele mult mai răspîndite decît precedentele. În contrast cu regresiunea bolilor transmisibile prin germeni, după descoperirea antibioticelor, bolile ereditare înregistrează o creștere ale cărei cauze sînt complexe: lipsa unei terapii de fond, un procent mai mare de supraviețuire a acestor bolnavi, creșterea însăși a ratei de mutație din cauza condițiilor de mediu etc. Această patologie are importanță deosebită deoarece prin natura ei depășește sfera individuală, interesează populații întregi, cu extindere peste multe generații și se perpetuează peste epoci istorice. Sub acest aspect, dincolo de destinul individului, aceste boli privesc destinul societății umane.

Deja cu mult înaintea epocii mendeliene, genetica umană a acumulat un material faptic important, înscris în documentele istorice sau medicale. Datorită progreselor științelor biologice realizate în ultimii ani, s-a ajuns treptat la „desmembrarea" acelui voluminos capitol de patologie, învăluit odinioară de mister, care cuprindea „bolile idiopatice". Tot mai multe din bolile încadrate în grupul „patologiei fundamentale" se dovedesc a avea la bază o eroare biologică înnăscută.

Genetica populațiilor are vaste domenii de studiu încă insuficient explorate. Pînă în prezent sînt cunoscute circa 2 000 de boli genetice umane; din acestea 200—300 au o importanță mai mare prin răspîndirea

Scanned with OKEN Scanner

sau gravitatea pe care o prezintă (137). Se apreciază că circa 4% din nou-născuți sînt purtătorii unor defecte genetice și că cel puțin 6% din bolnavii care se prezintă la consultații medicale ambulatorii sînt purtătorii unor tare ereditare. Unele boli grave, cu mare răspîndire în zilele noastre, din toate domeniile patologiei (boli digestive, cardiace, de nutriție etc.) au o determinare ereditară directă sau indirectă, iar predispoziția ereditară la o serie de boli (între altele și neoplazice) este bine cunoscută. În ultimii ani, prin avîntul pe care l-a înregistrat genetica, asistăm la o adevărată „vînătoare" după variante genetice ale diferitelor enzime, hemoglobine și alte proteine abordabile prin tehnicile moderne de biochimie, serologie etc. (115, 174).

În funcție de domeniul cercetării științelor biologice, genetica poate avea aplicații în virusologie, microbiologie, agronomie, zootehnie, medicină etc. În sens restrîns, toate specialitățile medicale își au o patologie ereditară, iar hematologia ocupă unul din locurile principale.

Studierea bolilor genetice ale eritrocitului a contribuit mult la progresul geneticii umane în general, datorită faptului că, spre deosebire de alte țesuturi, sîngele se obține ușor, nu necesită tehnici complicate de preparare, se pot efectua din el concomitent determinări citologice, biochimice și serologice variate.

Anomaliile genetice ale eritrocitului se întîlnesc la o parte importantă a populației. Unele din ele au o răspîndire evidentă în anumite zone geografice (explicată prin migrațiile unor grupuri de populații), pe cînd altele sînt „ubiquitare". Unele din aceste boli interesează direct eritrocitul (hemoglobinozele, enzimopatiile eritrocitare etc.), pe cînd altele interesează în mod indirect metabolismul eritrocitar, de exemplu lipsa transporturilor de fier sau de hemoglobină (atransferinemia, ahaptoglobinemia), tulburări de absorbție a vitaminei B_{12} (prin defect genetic) etc.

Trebuie făcută distincția (nu totdeauna ușoară) între *genopatiile ereditare (constituționale)* și *bolile congenitale*. În bolile constituționale, un individ se naște bolnav deoarece zestrea sa genetică nu poate asigura „programul" normal care asigură starea de sănătate (266). Bolile congenitale sînt prezente la naștere, dar nu sînt obligatoriu ereditare (sînt dobîndite intrauterin și sînt netransmisibile). Se știe că numeroși factori etiologici externi (ca unele toxice, medicamente, viroze, radiații ionizante și altele) pot acționa nociv asupra embrionului, mai ales în perioada organogenezei; acesta poate prezenta la naștere anomalii diverse, deși părinții nu sînt purtătorii nici unei tare ereditare. Pe de altă parte, o boală cromozomială nu este neapărat ereditară sau congenitală (prenatală), ci ea poate fi cîștigată și postnatal.

2. PROFILAXIA ȘI PROBLEMELE MEDICO-SOCIALE ALE BOLILOR EREDITARE

În țara noastră bolile ereditare ale eritrocitului nu sînt excepționale.

Aceste boli nu pot fi tratate decît paleativ; pot fi însă combătute și trebuie luate unele măsuri de eradicare a lor într-un răstimp de mai

Scanned with OKEN Scanner

multe generații, iar pentru generațiile prezente se impune, de asemenea, adoptarea unor măsuri medico-sociale în urma cărora să beneficieze, pe cît posibil, atît indivizii, cît și societatea noastră. Cum corectarea genotipului anormal este încă departe de posibilitățile noastre actuale, trebuie să se acorde o cît mai mare importanță măsurilor de îngrădire a propagării tarelor la generațiile următoare și prin aceasta la eliminarea lor.

Dintre primele măsuri profilactice și medico-sociale care ar putea fi întreprinse în acest domeniu amintim:

a. **Înscrierea facultativă pe buletinele de identitate a unora din aceste tare.** În scopul protejării indivizilor purtători ai unor boli ereditare, s-ar putea înscrie în buletinul de identitate (alături de grupa sanguină), la cererea personală sau a familiei, unele din aceste anomalii. O parte din bolile moleculare nu pot fi cunoscute imediat de medicul chemat să acorde primul ajutor acestor bolnavi, din care mulți nu sînt în măsură să atragă atenția asupra existenței acestor tare chiar dacă le sînt cunoscute (stare de șoc, comă, subdotare intelectuală, prima manifestare a bolii etc.). O porfirie intermitentă acută, ce se prezintă la cabinetul medical cu colici, ce pot mima un abdomen acut, poate duce la o intervenție chirurgicală inutilă și agravantă. Un bolnav hemofilic, supus nepregătit în prealabil, unui act chirurgical cît de mic, ar putea suferi o hemoragie fatală etc. Cunoașterea din primul moment a unor tare eritrocitare ar facilita conduita terapeutică medicală, de exemplu, crizele de aplazie acută din sferocitoza ereditară, crizele hemolitice prin deficit de G-6-PD, infarctele splenice și trombozele din formele homozigote a unor hemoglobinoze sau hemoglobinopatii și altele. Acestea sînt doar cîteva exemple care ar justifica adoptarea unei astfel de măsuri.

b. **Sfatul genetic.** Recomandările medicale făcute în astfel de cazuri de cabinete specializate ar fi o necesitate socială dacă metoda ar fi bine înțeleasă și corect aplicată. Există numeroase cupluri care ar accepta de bună voie evitarea riscului de a transmite tara lor copiilor pe care i-ar procrea, chiar dacă la părinți ea este într-o formă incipientă. Urmarea acestor recomandări de către părinți are cu atît mai multe șanse, cu cît aceștia au avut în prealabil un copil tarat. Medicul care ar neglija avertizarea părinților în legătură cu repercusiunile pe care le-ar putea avea nașterea unor copii anormali, ar comite o mare greșeală (178).

c. **Legislația sanitară.** După cum căsătoria este împiedicată în prezent în cazul în care una din persoane suferă de lues sau tuberculoză sau dacă ambele persoane au o anumită infirmitate evidentă, controlul prenupțial s-ar putea extinde și asupra bolilor ereditare. Fără aceste măsuri nu se poate contribui la eradicarea lor.

d. **Baremul de maladii** care permit **întreruperea sarcinilor.** Acest lucru ar trebui să cuprindă un paragraf special rezervat maladiilor ereditare. Femeile cu talasemie, sferocitoză ereditară, porfirie, osteopetroză etc. nu trebuie obligate să nască în cazul că sînt gravide, decît dacă o fac pe propria răspundere, după ce au fost avertizate de urmări. Chiar și bolile care nu sînt manifeste la femei (deficit de G-6-PD), hemofi-

Scanned with OKEN Scanner

lie etc.) dar a căror tați sau frați suferă de aceste tare, ar putea intra în categoria avortului terapeutic.

e. **Asistența medico-socială** a copiilor și a adulților purtători de forme homozigote (de exemplu boli hemolitice) sau de forme hemizigote (de exemplu, hemofiliile) care, în mare măsură, sînt handicapați social, rămîne o problemă deschisă la care se pot aduce îmbunătățiri (școli speciale, orientări profesionale, încadrări în muncă adecvată etc.).

Medicii, indiferent de specialitate și de locul lor de muncă, sînt cei care vin în contact nemijlocit cu bolnavii purtători de tare ereditare. Ei trebuie să studieze activ răspîndirea lor familială, rezultatele urmînd să fie folosite la studiul organizat pe plan național. De la cel mai îndepărtat dispensar medical de adulți sau de copii, pînă la unitățile unde se aprofundează problemele de genetică medicală, medicii pot aduce contribuții prețioase la cunoașterea acestor probleme fundamentale ale bolilor ereditare (de exemplu, în unele hemopatii care se pretează bine la astfel de studii), urmînd ca, pe baza experienței cîștigate, să se extindă această acțiune. În acest domeniu se poate aplica cu multă eficiență practică dezideratul *îmbinării armonioase între cercetarea fundamentală și cea aplicativă.*

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 2

ERITROPOIEZA

Studiul eritropoiezei are ca obiectiv, pe de o parte, cercetarea proliferării și diferențierii precursorilor eritrocitari împreună cu biosintezele lor specifice, iar pe de altă parte studierea procesului de trecere în circulație a eritrocitelor apte pentru funcția de transport a gazului respirator, precum și a factorilor care reglează aceste procese în funcție de distrugerile fiziologice și patologice. Eritropoieza cuprinde numai o parte a existenței eritrocitelor, anume, etapa de la inițierea formării pînă la lansarea în circulație a celulelor finite. Etapele următoare, de stadiu funcțional și de retragere din circulație aparțin altor aspecte ale vieții eritrocitare.

Eritronul este o concepție morfo-funcțională care cuprinde totalitatea elementelor ce fac parte din seria eritrocitară, elemente mature sau imature, circulante sau fixe, vasculare sau extravasculare. Termenul de eritron a fost adoptat de Castle și Minot (1936) după Boycott (1929) pentru a indica totalitatea elementelor seriei roșii, fie că sînt celule în proliferare, fie că sînt celule funcționale, transportoare de oxigen, sau în curs de distrugere (catabolism). Sub acest aspect noțiunea de eritron cuprinde *nașterea, viața* și *moartea eritrocitară.*

În condiții normale eritronul manifestă o remarcabilă constanță: variațiile activității lui sînt neînsemnate din cauza unui echilibru între rata de producție și cea de distrucție. Măduva furnizează în permanență sîngelui circulant o cantitate de eritrocite egală cu aceea distrusă în intervalul respectiv de timp. În afara stărilor de eubioză, pot apare oscilații importante ale acestei balanțe, dictate de stimuli interni sau externi, cu scopul de a menține în echilibru constantele eritrocitare de bază. Cînd mecanismele reglatoare sînt depășite se instalează starea de anemie sau de poliglobulie (187, 333) (fig. 2-1).

Scanned with OKEN Scanner

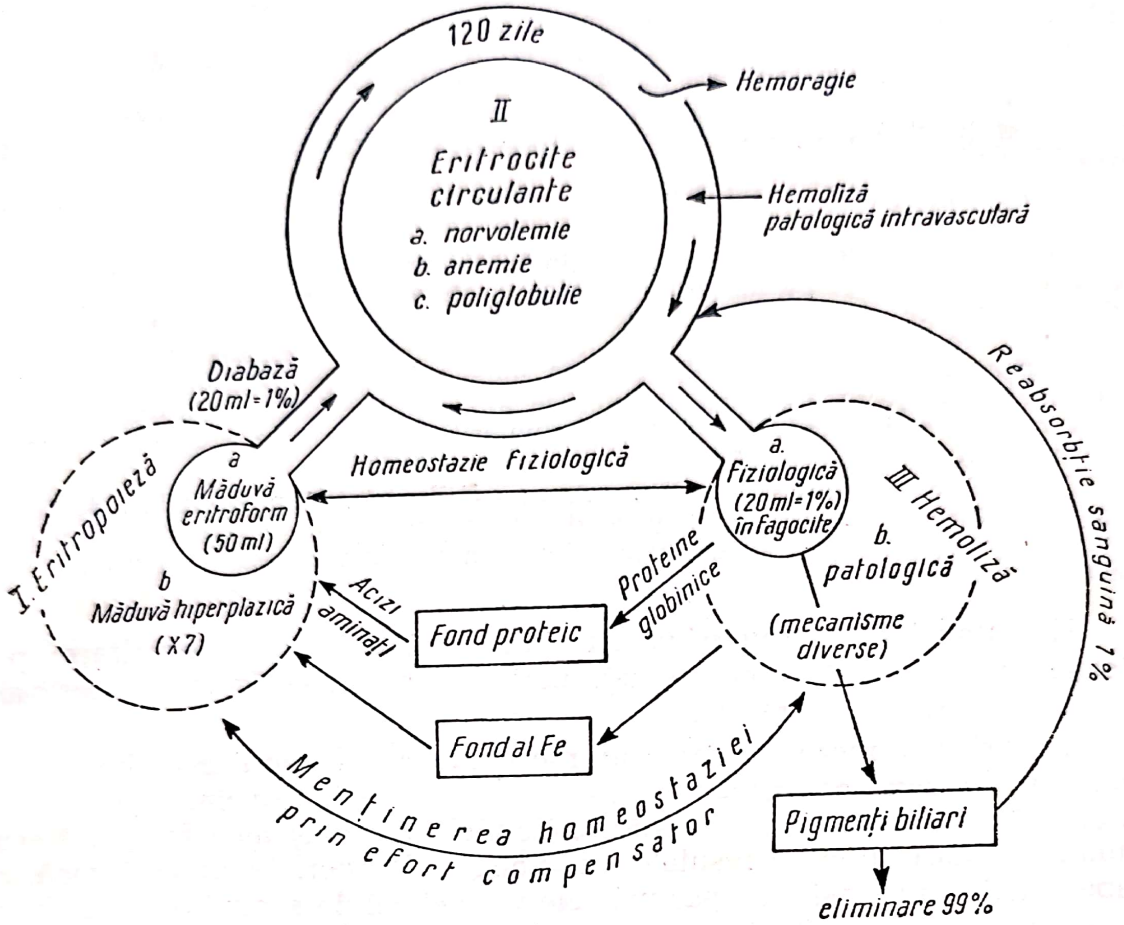


Fig. 2-1. Reprezentare figurativă a noțiunii de „eritron". (Modificat după M. Wintrobe, 1967).

În mod normal, masa de sînge circulant se menține la un nivel constant datorită unor mecanisme reglatoare (asemenea unui bazin în permanentă primenire, între debitul de evacuare și cel de umplere existînd o corelație perfectă). Dacă nivelul acestuia scade apare anemia, iar dacă crește apare poliglobulia. Cînd între golire și umplere se menține un echilibru, pierderile eritrocitare sînt compensate, chiar dacă cele două sectoare sînt crescute. Procesele patologice eritrocitare sînt legate de dereglarea menținerii acestui echilibru; în timp ce producția poate fi diminuată, normală sau crescută, distrucția nu poate fi decît normală sau crescută. Anemia apare, fie în urma creșterii pierderilor sau a distrugerilor eritrocitare, fie în urma descreșterii producției eritrocitare sau a combinațiilor dintre acestea.

I. MORFOLOGIA ȘI DINAMICA ERITROPOIEZEI

A. CARACTERELE MACRO- ȘI MICROSCOPICE ALE ORGANULUI HEMATOPOIETIC

1. ERITROPOIEZA PRENATALĂ

Hematopoieza apare încă din primele săptămîni ale vieții intrauterine; prezența celulelor sanguine se constată la început extraembrionar, apoi în teritoriile extramedulare și numai înainte de naștere este medulară (9, 167, 209, 230, 296, 101).

Scanned with OKEN Scanner

Rememorînd cîteva date de embriogeneză, amintim că dezvoltarea intrauterină cuprinde trei perioade care se intrică între ele:

— *perioada de ou sau zigot*, care începe o dată cu fecundația și se termină în faza de blastulă; durata ei este de circa o săptămînă;

— *perioada embrionară*, care începe cînd zigotul a ajuns în stadiul de gastrulă și se termină o dată cu începutul diferențierii organelor; durata ei este de circa 2 luni;

— *perioada fetală* care începe concomitent cu organogeneza și se termină la naștere.

Mezodermul (foița mediană) ocupă inițial o mare parte din volumul embrionului, dar se restrînge pe măsură ce acesta se dezvoltă; restrîngerea se realizează prin fragmentare sub formă de insule de celule. Din dezvoltarea mai departe a celor trei straturi celulare vor rezulta toate țesuturile și organele viitorului organism uman. Discul embrionar se dezvoltă mult în lungime; extremitatea cefalică este mai voluminoasă. La sfîrșitul celei de a treia săptămîni, embrionul măsoară 1,5—2 mm; el este acum bine nidat; prelungirile trofoblastice alcătuiesc vilozitățile coriale (fig. 2-2).

Mezenchimul — derivat din mezoderm — reprezintă un ansamblu de celule care se infiltrează în toate țesuturile, dar în primul rînd în anumite organe cu potențial celulo-formator sau secretor ridicat, ca măduva osoasă, formațiunile limfoide, ficatul etc.

Hematopoieza intrauterină cuprinde trei etape de dezvoltare: perioada mezodermică (prehepatică), perioada hepato-splenică și perioada medulară, intricate între ele.

a. **Perioada mezodermică sau mezoblastică.** Începuturile hematopoiezei au loc extraembrionar, într-o zonă care este cuprinsă între ecto- și endoderm, numită *arie vasculară*. Celulele mezodermice formează acumulări celulare, numite insulele lui Wolff și Pander. În această zonă, cu aspect mai mult sincițial, apar primele vase și celule sanguine ale embrionului (hemangioblești). Aceste celule periferice se alungesc și devin viitoarele celule endoteliale, care formează pereții vaselor embrionare; ele încep să secrete un lichid care poate fi considerat viitoarea plasmă sanguină. Din stratul intern al peretelui vascular se desprind primele celule mobile ce plutesc în plasma sanguină primitivă, devenind elementele figurate sanguine primitive (hemoblaștii). Apare astfel dovedită provenienta unitară mezodermică comună, atît a celulelor sanguine libere, cît și a celor endoteliale care căptușesc vasele sanguine. Unele din celulele sanguine primitive apărute în vasele embrionului se încarcă ulterior cu hemoglobină de tip Gower 1 (tetramer ε), devenind eritroblești primitivi, iar altele devin leucocite primitive.

Primele celule sanguine ale embrionului sînt celule nucleate mari, încărcate cu hemoglobină, asemănătoare megaloblaștilor. Producția lor începe în săptămîna a 3-a; ele dispar din circulație o dată cu instalarea sintezei de factor intrinsec Castle.

Insulele sanguine, apărute întîi extraembrionar, se dezvoltă apoi și în interiorul embrionului formînd rețeaua sanguină intraembrionară; spațiile vasculare extra- și intraembrionare se contopesc formînd un singur sistem vascular. Unele vase se dezvoltă mai mult și dau naștere vaselor mari, iar o dată cu dezvoltarea cordului, sensul curentului sanguin duce la diferențierea arterelor de vene.

Scanned with OKEN Scanner

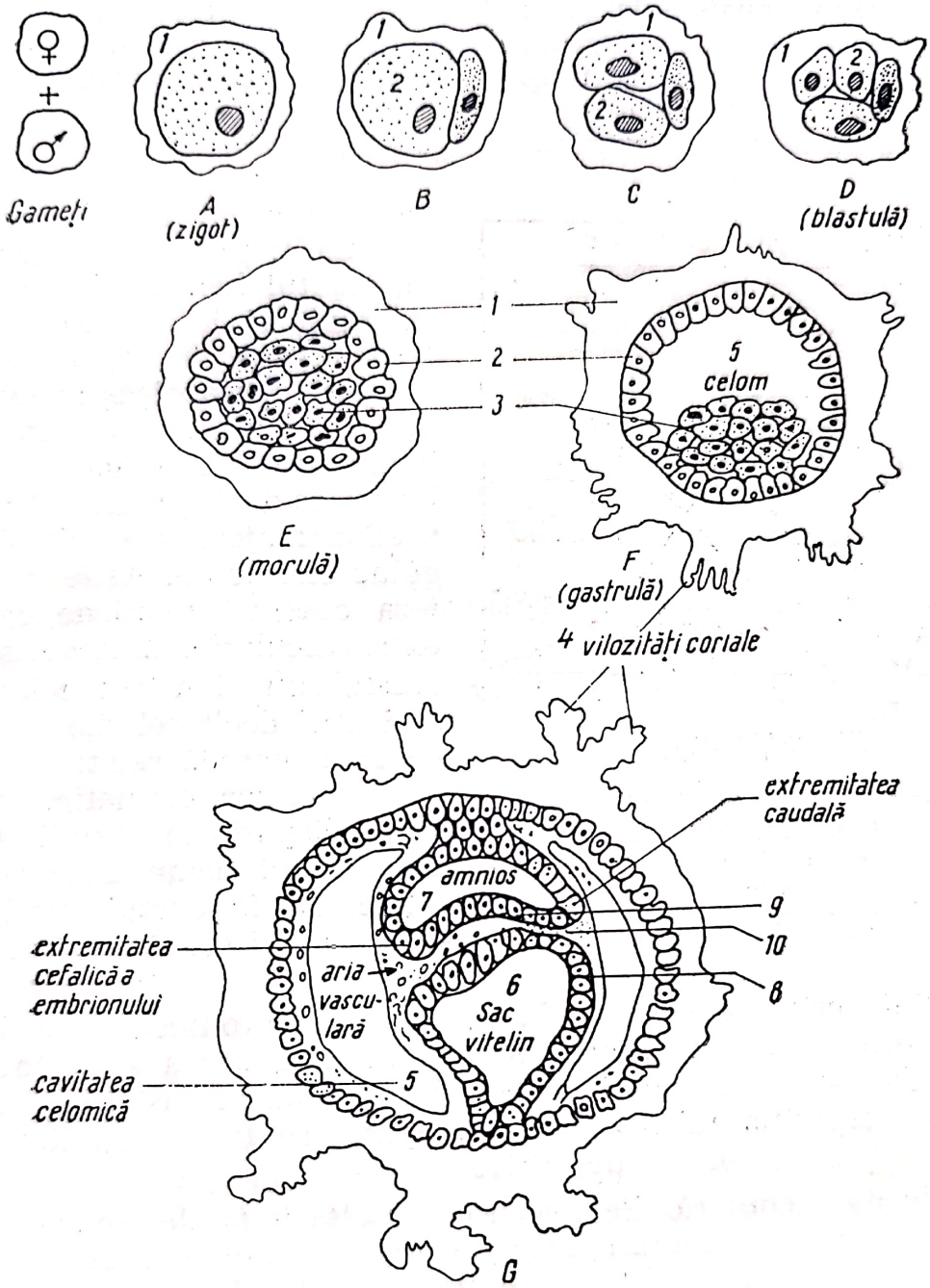


Fig. 2-2. Reprezentare schematică a primelor faze ale dezvoltării embrionare la om.

A=stadiul de zigot (ovul fecundat de către spermatozoid); B=segmentare în 2 blastomere inegale, macro- și micromere (segmentare inegală); C=stadiul de 3 blastomere (segmentare asincronă); D=blastulă cu mai multe blastomere; E=morulă; F=gastrulă (apariția unei cavități în interior, celomul); G=secțiune sagitală prin embrionul de două săptămîni (buton embrionar), care prezintă deja 3 cavități: celomul, sacul vitelin (viitorul cordon ombilical) și amniosul (lichidul în care „înnoată" embrionul, apoi fătul). Celulele butonului embrionar dinspre cavitatea amniotică formează membrana ectodermică, iar cele din spre cavitatea vitelină formează membrana entodermică. Ele se dezvoltă progresiv, ajungînd în contact. Între cele două foițe se dezvoltă cea de-a treia foiță, mezodermul. *Legenda:* 1=zona pelucidă; 2=blastomere; 3=buton embrionar; 4=vilozități coriale; 5=cavitatea celomică; sac vitelin; 7=cavitate amniotică; 8=ectodermul; 9=entodermul; 10=mezodermul.

Scanned with OKEN Scanner

b. **Perioada hepato-splenică** a hematopoiezei începe în cursul lunii a 2-a de dezvoltare intrauterină, cînd embrionul are o lungime de 5—7 mm; ea coexistă scurt timp cu hematopoieza mezoblastică, atinge nivelul maxim în trimestrul al doilea și scade în trimestrul al treilea, pentru ca la naștere să fie minimală (fig. 2-3).

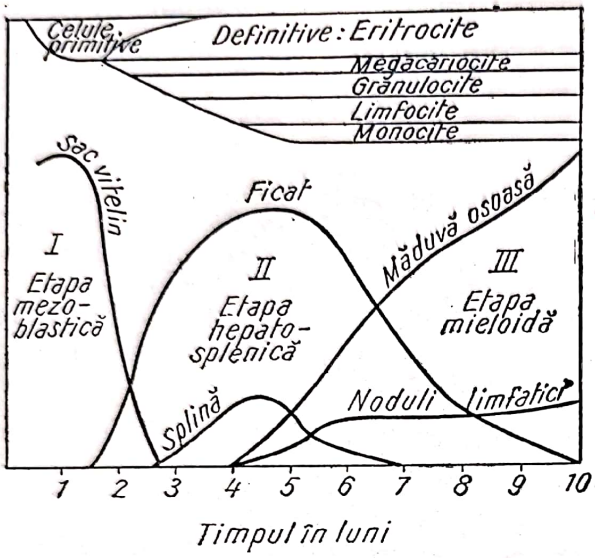


Fig. 2-3. Etapele hematopoiezei la embrion și făt (după M. Wintrobe, 1967). Reprezentare comparativă a participării principalilor centri ai hematopoiezei și perioada aproximativă în care își fac apariția diferitele tipuri de celule sanguine.

O dată cu dezvoltarea embrionului nevoia de sînge crește tot mai mult; proporțional cu aceasta, țesutul hematopoietic formează insule și infiltrate difuze în diferite organe. În săptămîna a 6-a începe hematopoieza intrahepatică prin pătrunderea mezenchimului în mugurele epitelial al ficatului. La vîrsta de 2 luni ficatul și splina produc majoritatea celulelor sanguine circulante. Astfel hematopoieza devine tisulară, de organ (deci extravasculară). Eritroblaștii din aceste culturi hematopoietice sînt mai mici decît cei din etapa precedentă, posedă relativ puțină citoplasmă, iar cromatina nucleară este dispusă în grunji (normoblești). Tot acum apar și limfocitele, iar în cursul lunii a 3-a apar mielocitele și trombocitele, iar la sfîrșitul ei, eritrocitele.

În splină, eritropoieza este la început mai pronunțată decît leucopoieza; ea este de durată scurtă, scade din luna a 5-a și se încheie în cursul lunii a 6-a (deși uneori poate persista pînă la naștere). Paralel cu scăderea și dispariția mielopoiezei, în splină se instalează limfopoieza, care persistă apoi ca funcție definitivă.

c. **Perioada medulară.** Pe măsura dezvoltării fetale, concomitent cu stabilirea circulației placentare, apar țesuturi și organe noi; printre acestea este și măduva osoasă și sistemul limfatic. Pe la vîrsta de 4—5 luni, în perioada de apogeu a hematopoiezei hepato-splenice, măduva osoasă începe să preia de la ficat și splină funcția hematopoietică. În luna a 6-a cele două tipuri de hematopoieză au o pondere aproximativ egală; în luna a 8-a hematopoieza medulară predomină, iar la naștere este exclusivă; cea hepatică poate exista ca vestigii; hematopoieza extramedulară (metaplazia mieloidă) este totdeauna patologică în viața extrauterină.

La începutul lunii a 6-a toate elementele figurate ale sîngelui adult sînt prezente și la făt, astfel încît la începutul ultimului trimestru de gestație sîngele fătului devine asemănător cu al adultului.

Țesutul sanguin la nou-născut mai păstrează, o perioadă, caracteristica hematopoiezei intrauterine, de a reacționa la anumiți stimuli nocivi,

Scanned with OKEN Scanner

prin trecerea în circulaţie cu multă uşurinţă a elementelor imature din seria eritrocitară, granulocitară sau limfatică.

Hematopoieza difuză embrionară, care dispare practic la naştere, are o mare importanţă teoretică deoarece ţesutul mezenchimal păstrează toată viaţa un potenţial hematoformator care devine însă manifest în anumite stări patologice (de exemplu în unele hemopatii maligne). Această omnipotenţă a mezenchimului este sugerată de însăşi stadiul dezvoltării organelor hematopoietice.

2. ERITROPOIEZA POSTNATALĂ

a. **Caracterele macroscopice ale organului medular.** Măduva osoasă, din cauza fragmentării şi a discontinuităţii ei topografice, nu oferă impresia morfologică de organ. Ea reprezintă totuşi un organ specializat în formarea elementelor figurate sanguine şi, ca orice organ, are un volum, o structură şi anumite funcţii (143).

Volumul medular. Aprecierea volumului medular este dificilă din cauza dispoziţiei dispersate a acestui organ. Unele din primele determinări volumetrice provin de la H. Mechanic (1926); ele au fost confirmate în mare parte de cercetările ulterioare. Media obţinută a fost de circa 4,6% din greutatea corporală, cu variaţii de la un individ la altul. R. P. Custer (1949) indică cifre extreme cuprinse între 1 320 şi 4 192 ml; tot el ajunge la concluzia că un individ de circa 70 de kg posedă o măduvă în greutate medie de 3 220 g. Putem considera deci că volumul medular variază între 2 000 şi 4 000 cm^3 cu o medie de 3 kg.

Topografia măduvei osoase. Măduva osoasă hematogenă la adult este repartizată, în general, în oasele late, oasele scurte ale extremităţilor, epifizele oaselor lungi, stern, corpurile vertebrale, coaste, omoplaţi, oasele bazinului, oasele craniene.

În mod fiziologic sau patologic repartiţia măduvei hematopoietice este supusă la variaţii considerabile, atît pe sectoare ale scheletului, cît şi la nivelul aceluiaşi os. Se constată uneori distribuţii asimetrice între zonele corespunzătoare din jumătatea dreaptă sau stîngă a corpului. Expansiunea şi represiunea medulară (ambele reversibile) se petrec uneori cu viteză mare, în funcţie de gradul de solicitare a hematopoiezei (143).

Măduva activă şi măduva de rezervă. Aproximativ jumătate din măduva unui individ adult este măduvă roşie, activă, hematogenă, iar cealaltă jumătate, măduvă de rezervă (fig. 2-4). Măduva roşie, estimată la adult la circa 1 600 g, echivalează sau chiar depăşeşte greutatea ficatului (38, 143, 271). La nou-născut şi la copilul pînă la 5 ani toate cavităţile medulare sînt umplute cu măduvă hematopoietică; ulterior are loc o scădere progresivă a proporţiei măduvei roşii. La persoanele de vîrstă înaintată măduva roşie se reduce la mai puţin de jumătate din volumul total, dar chiar la vîrsta de 70 de ani anumite oase ca sternul, vertebrele etc. rămîn încă bogate în măduvă roşie (132).

Un sfert, pînă la o treime din teritoriul măduvei roşii a adultului este ocupat de măduva galbenă. Această măduvă de rezervă deţine un

Scanned with OKEN Scanner

important potenţial de transformare în măduvă activă. Expansiunea măduvei roşii în teritoriul măduvei galbene începe cu dispariţia vacuolelor grăsoase din zonele măduvei roşii.

În timp ce copilul pînă pe la vîrsta de 5 ani nu are măduvă galbenă, la bătrîni expansiunea măduvei galbene poate ajunge pînă la limita mi-

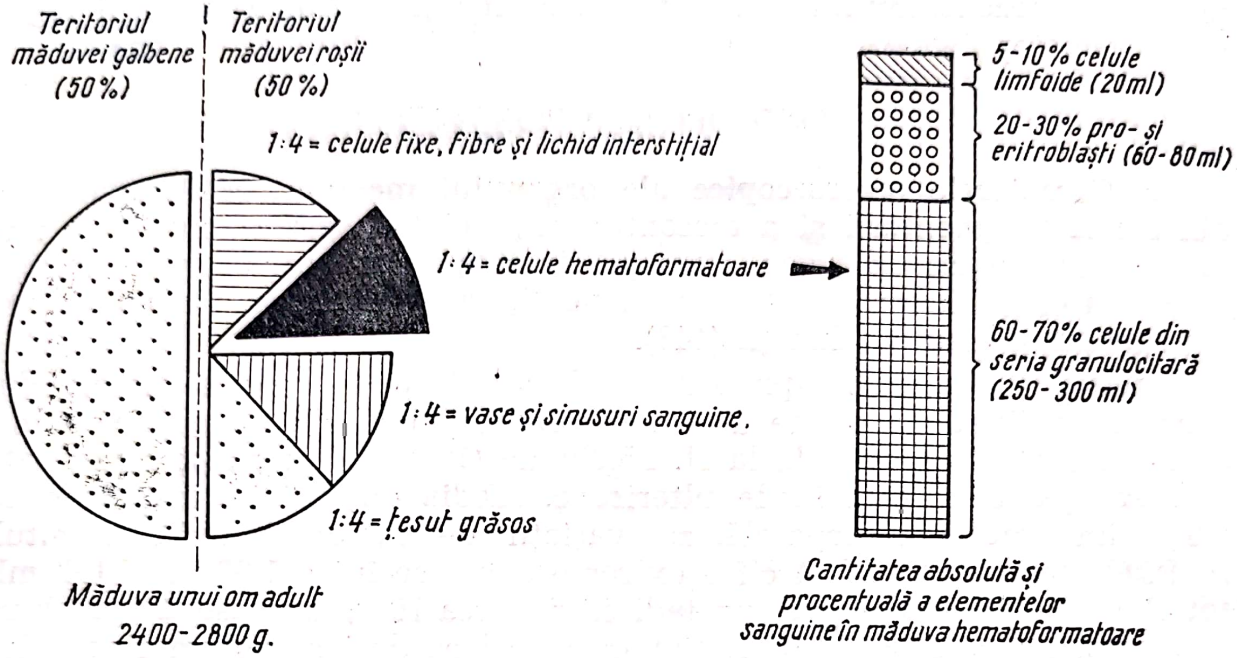


Fig. 2-4. Reprezentare grafică a volumului măduvei osoase la un adult şi defalcarea acestuia pe componente funcţionale.

Din cele 2—3 kg de măduvă osoasă, circa jumătate reprezintă măduva galbenă şi jumătate măduvă roşie. Din totalul măduvei roşii celulele hematoformatoare ocupă doar 1/4, iar celelalte 3/4 revin: 1/4 ţesutului grăsos, 1/4 vaselor şi sinusurilor sanguine şi 1/4 celulelor şi fibrelor conjuctive. În dreapta imaginii este redată proporţia globală a principalelor serii sanguine din mielograma normală.

nimă compatibilă cu o hematopoieză încă normală. De aceea, în condiţii de solicitări crescute, cele două vîrste extreme fac mai uşor anemii, trombocitopenii sau leucopenii.

b. **Structura histologică a măduvei roşii.** Măduva osoasă este un organ heterogen format dintr-o mare varietate de celule şi ţesuturi (200, 271). Asemenea lobulilor hepatici, nefronilor, foliculilor limfatici etc., măduva hematopoietică este grupată în mici compartimente ce corespund, de regulă, cavităţilor din spongioasa oaselor. Pe secţiunea unui os lat sau scurt, sau pe secţiunea unei epifize de os lung, se disting mai multe componente tisulare intricate: osoasă, conjunctivă, grăsoasă, vasculară şi hematopoietică.

1) *Componenta osoasă* asigură protecţia şi suportul ţesutului medular. Între componenta osoasă şi cea medulară există însă corelaţii funcţionale reciproce, care depăşesc pe cele dintre un simplu conţinut şi conţinător (108, 206). Spongioasa osoasă este alcătuită din travee anastomozate ce delimitează între ele mici cavităţi. Se apreciază că la adultul tînăr componenta lamelară reprezintă pînă la 50% din totalitatea spaţiu-

lui spongioasei. Aceste cavităţi sînt tapisate de o peliculă formată din celule conjunctive plate, numită *endost;* ea separă spaţiul medular de substanţa osoasă şi are o funcţie osteoblastică şi una osteoclastică. În regenerările osoase (osteogeneză) aceste celule se măresc transformîndu-se în osteoblaşti; ele formează matricea viitorului os. Alteori se produce procesul invers, de neoresorbţie osoasă; celulele care tapisează traveele îşi schimbă radical structura şi funcţia, devin celule gigante, multinucleate (osteoclaste), asemănătoare megacariocitelor de care se pot însă deosebi uşor. Ele sînt localizate pe lamelele osoase într-o mică anfractuozitate (lacunele Howship), ceea ce ilustrează rolul lor osteolitic; alteori ambele procese coexistă pe aceleaşi travee osoase.

Dezechilibrul dintre resorbţie şi osteoformare perturbă dinamica osoasă. Diminuarea cantităţii de ţesut osos (osteopenie) este denumită radiologic *osteoporoză,* pe cînd supraformarea de ţesut osos este denumită *osteocondensare.* Involuţia masei de ţesut osos se instalează, fiziologic, odată cu înaintarea în vîrstă, iar patologic apare în numeroase boli hematologice şi nehematologice. Procesul invers, de condensare osoasă (fără creşterea de volum a osului), se realizează prin două mecanisme: *apoziţie osoasă* (îngroşarea osului preexistent) şi *neo-osteogeneză* (formarea de travee osoase noi pe seama ţesutului conjunctiv) (206, 271).

2) *Reticulul medular (sau stroma conjunctivă)* este alcătuit din fibre şi din celule conjunctive. În ochiurile reticulului se dezvoltă celulele „parenchimului" medular cărora îi oferă condiţii de dezvoltare. Studiul stromei a căpătat în ultimii ani o interpretare predominant dinamică.

Sistemul de reţele care împînzeşte cavitatea spongioasă este format din fibre de colagen şi din fibre de reticulină. *Fibrele de colagen* se găsesc în număr mare în capsulă (endost), de unde se desprind din loc în loc şi pătrund în interior sub formă de travee conjunctive ce pot fi evidenţiate cu ajutorul coloraţiei *Van Gieson* sau *tricrom Masson.* Traveele se împletesc şi intră în legătură intimă cu pereţii vaselor. *Fibrele de reticulină* apar după impregnaţia cu argint care le colorează în negru (*col. Gömöri, col. Leidlaw* etc.). Ele sînt mult mai subţiri decît cele de colagen şi formează o reţea aparte de fibre fine, ce desemnează un „grilaj" în ochiurile căruia se găseşte ţesut hematopoietic. Sistemul de fibre de reticulină din măduvă este mai discret decît cel din alte organe (ganglioni, splină, ficat etc.); în nici un organ ele nu sînt vizibile la coloraţia May-Grünwald-Giemsa. În anumite stări patologice (osteomielosclerozăă) această reţea se hipertrofiază mult, mutilînd cavităţile medulare şi dislocînd celulele mieloide. Geneza acestor fibre ţine de celulele conjunctive locale (fibroblaşti, fibrocite). Disocierea prin edem sau ruperea fibrelor prin hemoragii influenţează negativ hematopoieza.

Celulele stromale (nediferenţiate şi diferenţiate) reprezintă o componentă heterogenă şi încă imprecis delimitată; ele fac parte din celulele conjunctive; originea lor este mezenchimală. Din grupul acestor celule fac parte histioblaştii şi histiocitele şi fibroblaştii şi fibrocitele; celelalte celule „reticulare" specializate, cuprinse altădată în acest grup, au tan-

Scanned with OKEN Scanner

genţe strînse cu alte structuri, de exemplu eozinocitele cu eozinofilele, mastocitele cu granulocitele bazofile, plasmocitele cu limfocitele etc. Macrofagele sînt celule histioide angajate în îndepărtarea „deşeurilor" sanguine; lipoidocitele sînt şi ele celule fagocitare cu rol în depozitarea particulelor lipidice etc. Morfologia şi funcţiile celulelor reticulare medulare constituie un capitol care mai prezintă pe alocuri unele lacune şi controverse (vezi şi pag. 94).

3) *Ţesutul grăsos* este constituentul natural al măduvei grase, inactive din diafizele osoase, dar este bine reprezentat la adult şi în măduva hematoformatoare. El se prezintă sub formă de vacuole grăsoase formate din adipocite. Nucleul foarte aplatizat al acestora nu este totdeauna evidenţiabil pe secţiuni. Veziculele grăsoase, bine vizibile pe preparatele histologice, îşi pierd structura la coloraţia panoptică, apărînd optic goale. Pe o secţiune de măduvă roşie normală ele ocupă la adult circa 1/4—1/3 din suprafaţa intertrabeculară totală; la copil veziculele grăsoase sînt reduse, iar la bătrîn predomină faţă de celulele hematoformatoare. În cazuri de aplazie medulară suprafaţa ocupată de vacuolele adipoase este net predominantă, spaţiile medulare lăsate libere de către celulele mieloide fiind ocupate de adipocite; celulele parenchimatoase restante ocupă mici insule izolate cuprinse între spaţiile dintre aceste vacuole. Între masa osoasă spongioasă şi cea adipoasă medulară există, de asemenea, o corelaţie de proporţionalitate inversă; în caz de expansiune a traveelor osoase retrocedează ţesutul adipos şi invers; acest proces nu are echivalent în alte organe. În cazuri de hiperplazie medulară vacuolele grăsoase se reduc rapid, pînă la dispariţia totală, cedînd locul ţesutului mieloid.

Ţesutul grăsos derivă din reticul deosebindu-se prin aceasta de restul ţesutului grăsos din organism. Un individ care slăbeşte nu-şi reduce măduva grăsoasă; ea se comportă mai mult ca o măduvă hematopoietică întrucît aici se află numeroase celule omnipotente care, sub influenţa anumitor stimuli, se poate transforma în măduvă activă (232, 271).

Vacuolele grăsoase sînt înconjurate de o reţea fină de reticulină vizibilă la impregnarea argentică. După dispariţia grăsimii, reţeaua de reticulină ce înconjură vezicula adipoasă apare sub aspect de „coş de nuiele".

4) *Reţeaua vasculară* a medularei este foarte bogată; ea reprezintă aproximativ 1/4 din volumul medular. Într-o măduvă foarte activă densitatea reţelei circulatorii funcţionale este mai mare decît în condiţii normale; în stare normală sinusoidele se dilată şi se contractă alternativ, ceea ce impulsionează circulaţia sanguină foarte lentă din acest teritoriu (206).

Joncţiunea capilarelor arteriale cu cele venoase se face prin porţiuni ce se lărgesc brusc, asemănătoare unor pîlnii, care reprezintă *sinusul venos* propriu-zis. Sinusurile venoase se continuă cu sinusurile contorte (şerpuite); acestea se varsă în sinusurile centrale, care colectează sîngele venos şi-l dirijează în venule. Spre deosebire de capilarele propriu-zise, sinusoidele nu au un traiect fix, propriu; ectaziile venoase se mulează pe parenchimul medular din teritoriul pe care îl deservesc (271).

Scanned with OKEN Scanner

Traversarea barajului sinusoidal de către elementele figurate sanguine se face prin mişcări ameboide, cu excepţia trombocitelor care sînt împinse prin aceşti pereţi de către megacariocitele din care provin (271). În afara conţinutului obişnuit în elemente figurate sanguine, sinusurile venoase medulare sînt bogate în reticulocite (care au traversat recent pereţii sinusali) şi în macrofage (acumulate aici pentru a fagocita eritrocitele îmbătrînite). Circulaţia în aceste ectazii vasculare este la început înceată (adevărate lacuri sanguine), apoi, pe măsură ce se recapilarizează, ea devine tot mai rapidă. Circulaţia lentă din aceste organe şi ţesuturi nu joacă numai rolul unui frenator al debitului circulator, ci totodată favorizează variate procese metabolice: schimburi de substanţe, activitate fagocitară etc.

5) „*Parenchimul hematopoietic*". Celulelor hematoformatoare care ar reprezenta „parenchimul medular" le revine, la adult, aproximativ 1/4—1/3 din volumul total al măduvei roşii (circa 500 ml). În realitate volumul ocupat de ele este şi mai mic, din cauza prezenţei lichidului interstiţial, care permite o anumită mobilitate a celulelor precursoare în cursul evoluţiei lor. La copil, spaţiile medulare fiind reduse, abia fac faţă nevoilor hematopoiezei; în cursul creşterii, spaţiile medulare se lărgesc.

Parenchimul hematopoietic este format din celule imature: celule stem (pluripotente sau orientate) şi precursori sanguini în diferite stadii de maturare ale *seriilor mieloide* (eritrocitară, granulocitară şi trombocitară); el conţine şi *foliculi limfatici,* care sînt, de asemenea, constituenţi normali ai măduvei roşii.

Celulele hematoformatoare se înmulţesc şi se maturează în comun; nu există nici un fel de membrană care să separe diferitele linii celulare, dar, cu toată heterogenitatea topografică, se poate recunoaşte o tendinţă de grupare în mici insule, mai evidentă la eritroblaşti. Pe frotiurile de măduvă osoasă se pot observa grupuri de eritroblaşti în acelaşi stadiu de maturare sau de vîrste apropiate, în dispoziţie strînsă. Această grupare este generată de mitozele în grup; ea poate fi urmărită mai bine în grunjii medulari.

Cuibul de eritroblaşti este o unitate histologică şi funcţională a eritropoiezei; el este format de una sau două celule centrale cu caracter de celulă macrofagă, înconjurate de o coroană de eritroblaşti (143, 165) (fig. 2-5). Schimbul de material de la celula macrofagă la eritroblast se efectuează prin rofeocitoză. Nu este exclus ca acelaşi mecanism să poată acţiona şi în sens invers, de exemplu în cazul unui exces de fier în eritroblaşti (exocitoză). Insula de eritroblaşti, avînd o structură fragilă, este frecvent dezintegrată de către presiunea negativă creată cu ocazia punctiei aspiratoare, de aceea ea se vede mai rar pe frotiurile medulare (341).

Nodulii limfatici sînt o constatare normală în măduva osoasă; prezenţa lor nu presupune existenţa unei metaplazii limfoide sau a unui proces inflamator. Pe frotiul medular limfocitele se găsesc într-o proporţie de pînă la 10—15% din totalul elementelor nucleate. Pe preparatele histologice foliculii limfatici se întîlnesc în circa 60% din cazuri; spre

Scanned with OKEN Scanner

deosebire de nodulii limfatici din ganglioni, ei nu au un centru germinativ evident (271, 132).

c. **Citologia normală a precursorilor eritrocitari.** Precursorii eritrocitari pot fi identificaţi pe baza anumitor caracteristici şi diferenţiaţi de celelalte celule hematopoietice aflate în diferite stadii de dezvoltare cu care se găsesc amestecaţi. Morfologia lor corespunde etapelor de dezvoltare în direcţia eritrocitului finit (52, 99).

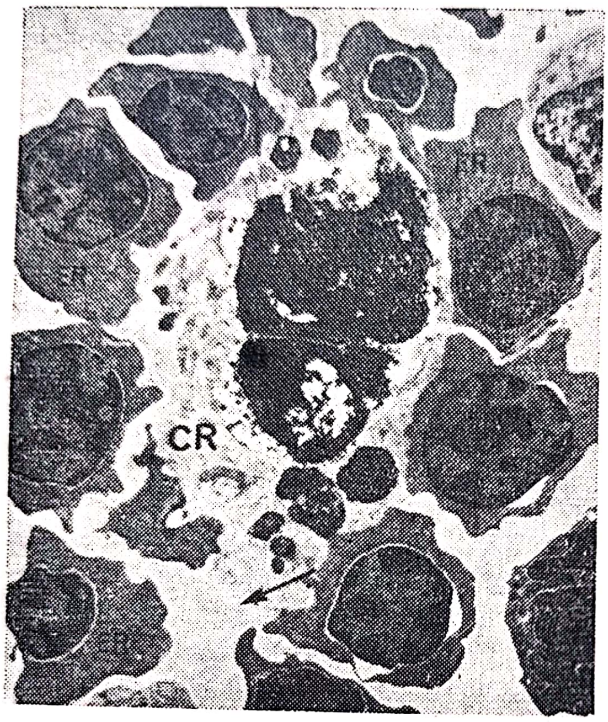


Fig. 2-5. Cuib de eritroblaşti examinat în secţiune la microscopul electronic cu o mărire redusă (× 5 700). (După E. Keyahani şi M. Bessis, 1969).

Celula „reticulară" centrală (CR) conţine diverse incluzii provenite din eritrocitele fagocitate, resturi de leucocite etc., digerate intracelular de către lizozomii din citoplasmă. Ea este înconjurată de numeroşi eritroblaşti (ER) printre care îşi trimite „voalurile citoplasmatice", în scopul realizării transferului de material nutritiv („celulă doică"), cuibul de eritroblaşti fiind considerat o unitate morfo-funcţională cu active schimburi reciproce de materiale.

Celulele sanguine tinere se recunosc după următoarele caractere: sînt mai mari decît cele mature, raportul nucleo-citoplasmatic este în favoarea nucleului (aproximativ 8/2); cromatina nucleară prezintă o structură de reţea finită; nucleul are 1—3 nucleoli vizibili; citoplasma este albastră, cu halou mai clar în jurul nucleului.

Pe măsura maturării celulare apar următoarele modificări: diametrul celular se reduce, raportul nucleo-citoplasmatic tinde să se inverseze (mai ales prin diminuarea progresivă a nucleului care la eritrocite se expulsează), nucleolii dispar încă din primele faze, cromatina nucleară devine mai densă şi se colorează cu intensitate inegală, colorabilitatea citoplasmei se schimbă pierzîndu-şi bazofilia şi capătă treptat proprietăţi specifice; pentru seria roşie este caracteristică încărcarea cu hemoglobină.

Este recomandabil ca examinarea celulelor sanguine să se facă după anumite criterii şi într-o anumită ordine, cu referiri la mărimea şi forma celulară, la raportul nucleocitoplasmatic, la nucleu (formă, număr, poziţie, structură cromatiniană, prezenţa, numărul şi forma nucleolilor) şi la citoplasmă (culoare, omogenitate, prezenţa granulaţiilor, incluziilor sau a vacuolelor).

1) *Grupul celulelor precursoare* (eritropoietino-sensibile).

a) *Celula stem.* La originea întregii activităţi hematopoietice din măduva osoasă rezidă celula stem; toate celulele ţesutului hematopoietic

Scanned with OKEN Scanner

derivă din această celulă omnipotentă. Fiind o celulă nediferențiată, ea poate să evolueze, după necesități, în mai multe direcții. Aceasta nu alimentează numai celulele precursoare ale diferitelor serii autohtone, ci are capacitatea de a migra pe cale sanguină sau limfatică, în alte organe sau structuri pe care le colonizează (splină, ganglionii limfatici, timus etc.). Țesutul hematopoietic fiind constituit din trei componente esențiale: celulele mieloide, celulele care asigură imunitatea naturală (mobile și fixe) și structurile conjunctive, s-ar deduce că celula stem s-ar putea diferenția în oricare din aceste direcții, după natura stimulului primit; cercetări recente conchid că celula stem este precursoare exclusiv pentru celulele sanguine (mieloide și limfoide) (18, 109, 160, 197, 228, 271) (fig. 2-6).

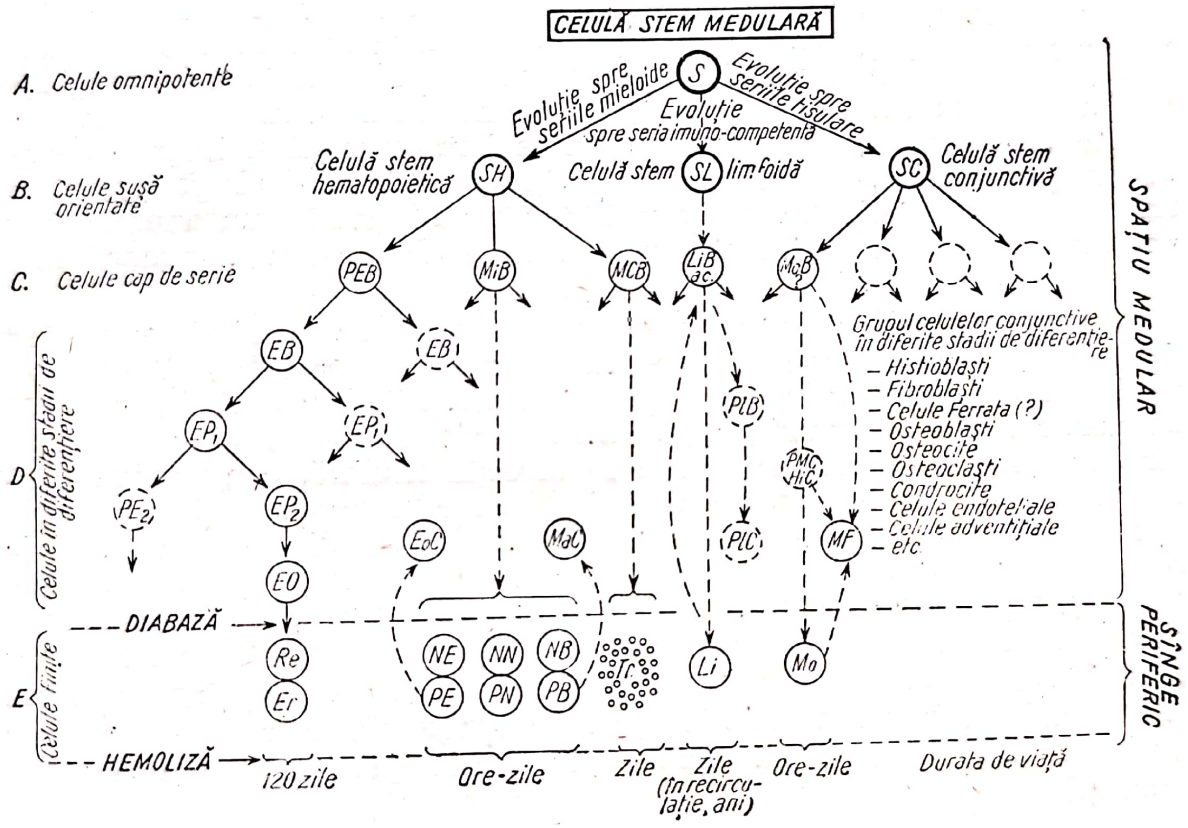


Fig. 2-6. Reprezentare sinoptică clasică a căilor de dezvoltare a celulelor stem. În viziunea modernă celulele reticulare (nehematopoietice) (flancul drept) (SC) nu derivă din celula stem.

La originea tuturor elementelor figurate sanguine sînt celulele stem polivalente. Măduva osoasă este rezervorul activ al acestora, atît pentru celulele care se dezvoltă intramedular (eritrocite, granulocite, monocite, trombocite etc.), cît și pentru cele care se diferențiază extramedular, în țesutul limfatic (limfocite și plasmocite). Celula stem este capabilă să răspundă la diferitele semnale specifice (ex. eritropoietina pentru seria roșie); pentru a intra în ciclul de diviziune și maturare „decizia" în direcția unei anumite orientări este dată de influența mediului. *Legenda:* S=celulă stem pluripotentă; SH=celulă stem orientată spre hematopoieză; SL=celulă stem orientată spre limfopoieză; SC=celulă stem orientată în direcția celulelor stromale (contestată de numeroși autori); PEB=proeritroblast; MiB=mieloblast; MCB=megacarioblast; LiBac=limfoblast activat; MoB=monoblast(?); EB=eritroblast bazofil; EP_1=eritroblast policromatofil neevoluat (capabil de mitoze); EP_2=eritroblast policromatofil evoluat (incapabil de mitoze); EO=eritroblast oxifil; Re=reticulocit; Er=eritrocit; NE=nesegmentat eozinofil; PE=polinucleat eozinofil; EoC=eozinocit; NN=nesegmentat neutrofil; PN=polinucleat neutrofil; NB=nesegmentat bazofil; EoC=polinucleat bazofil; MaC=mastocit; Tr=trombocite; PlB=plasmoblast; PlC=plasmocit; PMC (HiC)=promonocit sau histiocit(?); Mo=monocit; MF=celulă macrofagă.

În ultimii ani s-au efectuat numeroase lucrări experimentale din care unele au revoluționat datele clasice cunoscute pînă în prezent. Anii ce urmează probabil că vor adînci și vor îmbogăți ipotezele lansate în ultimii ani.

Întrucît informația genetică a celor mai complicate creaturi este repetată în totalitatea miliardelor de celule pe care acestea le posedă, cercetările au căutat să dovedească că din orice celulă din organism poate fi reprodus, în etape și în condiții propice de mediu, orice fel de tip celular.

Till, McCulloch, Moore, Owren, Metcallf și alții (90, 204, 205) au transplantat la animale celule precursoare din seria embrionară socotite celule eritroblastice. Acestea au dat naștere la colonii din toate seriile demonstrîndu-se capacitatea pluripotentă a acestor celule, considerate altădată „megaloblești embrionari". Acești autori au emis teoria migrării celulelor stem; ele trec din sacul vitelin în ficat, splină, timus, măduvă — organe care devin însămînțate cu celule hematopoietice. Migrarea este un proces continuu, celulele trecînd de la un organ la altul; pe măsură ce un organ hematopoietic intră sau își limitează funcția, un anumit timp pot exista, concomitent, mai multe organe funcțional hematopoietice (204, 303).

Morfologia celulei stem nu se cunoaște încă cu certitudine; au fost descrise mai multe aspecte morfologice; după toate probabilitățile această celulă nu are caracterele morfologice unitare. Fiind considerată o celulă cu particularități germinative („blastos") capabilă să evolueze, atît în direcția sanguină („haima"), cît și în direcția tisulară, conjunctivă „histios"). Ferrata a numit-o *hemo-histio-blast*. Alți hematologi (mai vechi și mai noi) au descris celula stem ca „limfocit", „limfoidocit", „celulă rotundă bazofilă" etc. Morfologia celulei reticulare nediferențiate rămîne deci o problemă deschisă; s-a folosit pentru ea și termenul de „precursor de nerecunoscut" („non reconnaissable"). În timp ce unii o descriu ca pe o celulă cu aspect de limfocit mic, alții înclină să o vadă printre elementele mieloide cele mai tinere. Întrucît această celulă nu aparține exclusiv măduvei osoase se oferă explicații pentru procesul de metaplazie patologică.

b) *Celula stem unipotentă* (hemocitoblastul vechilor autori) este o celulă mult discutată; chiar dacă morfologia este greu de identificat, existența lui trebuie admisă, cel puțin teoretic, ca pe o etapă intermediară între celula stem pluripotentă și celula cap de serie mieloidă (proeritroblast, mieloblast, megacarioblast). Bessis explică extrema lui raritate în măduvă prin caracterul fugace și probabil polimorf al acestei faze de trecere; dacă este surprins într-un stadiu de dezvoltare mai apropiat de celula stem nediferențiată (și ea probabil polimorfă) și celula stem orientată, se confundă cu aceasta, iar într-un stadiu de diferențiere mai avansată se apropie de caracterele seriei respective.

c) *Proeritroblastul* (denumit și pronormoblast) este prima etapă de diferențiere a celulei reticulare nediferențiate în direcția seriei roșii. El

Scanned with OKEN Scanner

prezintă caracteristicile celulei tinere, ceea ce îl apropie de celelalte celule cap de serie cu care se aseamănă uneori (mieloblast, limfoblast etc.) și de care nu este totdeauna ușor de diferențiat. Prefixul „pro" este neadecvat, întrucît situează pe nedrept această celulă înaintea echivalentelor sale din celelalte linii de celule sanguine (212).

D i m e n s i u n i ș i f o r m ă. Talia este mare, cuprinsă între 18 și 25 de microni. Conturul este rotund, bine delimitat, uneori cu o mică buclă citoplasmatică (ca o vîslă ce ar ajuta la deplasările ameboide).

N u c l e u l este voluminos, ocupînd circa 8/10 din suprafața totală a celulei, are o formă rotundă și o poziție ușor excentrică. Cromatina este colorată în violet purpuriu; bazicromatina și oxicromatina sînt dispuse în rețea fin împletită, dînd nucleului un aspect „perlat". Nucleolii sînt în număr redus (1 sau 2), excepțional mai mulți (3—4), mai puțin conturați în comparație cu ai altor celule sușă; culoarea lor este albastră deschisă; ei dispar rapid în cursul maturației.

C i t o p l a s m a este îngustă și intens bazofilă la periferie; în jurul nucleului citoplasma prezintă o zonă clară, cromofobă, ca o semilună, ce corespunde prezenței aparatului Golgi; în haloul luminos se văd unele granulații fine ce corespund mitocondriilor juxtanucleare.

F r e c v e n ț a proeritroblaștilor în mielograma normală este de 0,5—1,5%.

Criterii de diferențiere față de alte celule sușă. Proeritroblastul trebuie deosebit de mieloblast care are o structură nucleară mai fină (dantelată), cu nucleoli mai numeroși și mai evidenți; citoplasma lui este mai abundentă, de culoare albastră mai puțin intensă și cu halou perinuclear mai discret. În cazurile în care citoplasma conține cîteva granulații azurofile se exclude apartenența la seria roșie.

2) *G r u p a e r i t r o b l a ș t i l o r.* Caracterele optice ale precursorilor eritrocitari, ca și ale tuturor seriilor sanguine sînt într-o continuă schimbare dictată de apropierea lor de maturare. Aspectele anumitor prototipuri descrise mai jos sînt instantanee evolutive. În practică, o mare parte din precursorii eritrocitari se găsesc într-un stadiu intermediar pe care morfologul le încadrează arbitrar într-un anumit tip celular.

a) *Eritroblastul bazofil.* T a l i a celulei descrește la 12—18 μ; pot apărea prelungiri citoplasmatice de alt gen decît la proeritroblast, sub formă de punte ce unește cel mai adesea cîte doi eritroblești de aceeași vîrstă (bazofili sau policromatofili), situați uneori la distanță apreciabilă, rezultat al citodierezei. Raportul nucleo-citoplasmatic este de aproximativ 3/4.

N u c l e u l, lipsit de nucleoli, rămîne sferic, situat central; cromatina este dispusă în grămezi dense și neregulate, colorate în violet negricios, ceea ce îi dă un aspect caracteristic de tablă de șah, ce contrastează cu fondul palid, roz-violet al culorii nucleare de bază.

C i t o p l a s m a, mai abundentă decît la celula precedentă, rămîne intens bazofilă (chiar mai mult decît la proeritroblast). Eritroblastul bazofil este considerat celula medulară cea mai albastră; zona cromofobă perinucleară este mai puțin evidentă. Uneori se observă, în plină cito-

Scanned with OKEN Scanner

plasmă, numeroase mici puncte incolore (aspect în „picăţele") considerate imagini „în negativ" ale mitocondriilor.

F r e c v e n ţ a eritroblaştilor bazofili este de circa 10—25 la 100 de elemente ale seriei roşii (în medie 16). În această etapă se desfăşoară o intensă activitate metabolică (sinteză de globină şi de porfirină), precum şi o activitate mitotică vie. Uneori se observă celule cu 2 nuclei, urmare a unui asincronism dintre cariodiereză şi plasmodiereză, observate în cazuri de mitoză patologică.

Criterii de diferenţiere faţă de alte celule medulare. Confuzii pot ocaziona uneori celulele limfoide de tip plasmatic (plasmocitul atipic) cu nucleul dispus în „spiţe de roată" sau „cadran de ceas". La diferenţiere ajută, în afară de forma caracteristică şi dispoziţia nucleului, faptul că citoplasma eritroblastului bazofil nu are vacuole, iar nucleul apare fărîmiţat în bulgări mai numeroşi (de 15—20 faţă de 5—10 la plasmocit).

Eritroblastul bazofil II (sau eritroblastul policromatofil I). Morfologic, etapele de maturare ale seriei roşii nu se desfăşoară în salturi spre tipul celular următor, ci în succesiune lină, cu faze intermediare. De aceea, uneori aceşti precursori eritrocitari cu greu pot fi încadraţi în tipuri celulare precise; numeroase aspecte morfologice de graniţă sînt arbitrare, după aprecierea subiectivă a citologului, oricît de riguroase ar fi criteriile recomandate. Pentru a conferi mai multă precizie etapelor de maturare, unii autori propun forme intermediare suplimentare (eritroblast bazofil I şi II sau eritroblast policromatofil I şi II) care nu sînt însă necesare pentru practică. Pe de altă parte nici chiar eritroblastul bazofil şi cel oxifil nu sînt elemente pure întrucît primul conţine o anumită cantitate de hemoglobină, iar ultimul mai conţine elemente bazofile (acizi nucleici, organite etc.). *Stricto senso* ambele noţiuni sînt improprii. Eritroblastul policromatofil tînăr este capabil încă de diviziune, pe cînd în etapa de eritroblast policromatofil adult, celula nu mai are capacitate mitotică, în schimb sinteza de hemoglobină creşte continuu; concentraţia maximă a acesteia este atinsă abia în faza de eritrocit adult.

b) *Eritroblastul policromatofil* (normoblast policromatofil) prezintă cele mai mari variaţii morfologice în seria roşie, de la forme apropiate de eritroblastul bazofil, pînă la forme asemănătoare eritroblastului oxifil.

D i m e n s i u n i ş i f o r m ă. Talia celulei descreşte şi mai mult (10—12 μ); forma rămîne rotundă (ca de altfel pentru toate elementele seriei roşii).

N u c l e u l rotund se reduce din ce în ce mai mult şi este dispus uşor excentric ocupînd circa 50% din celulă. Raportul nucleu/citoplasmă se modifică în avantajul citoplasmei. Structura este mai condensată, iar blocurile de cromatină îi dau uneori un aspect de „spiţe de roată", dar nu atît de net ca la plasmocit.

C i t o p l a s m a imprimă acestei celule aspectul caracteristic: rămîne bazofilă la periferie, iar spre nucleu capătă progresiv o tentă verde bronzată, apoi portocalie şi în cele din urmă roz, cu acidofilie netă. Acest aspect depinde foarte mult de vîrsta celulei.

F r e c v e n ţ a lor în măduvă este de 40—60% din totalul celulelor eritrocitare nucleate (în medie 48%).

În rare cazuri eritroblaşti policromatofili patologici (microblaşti) pot fi confundaţi cu limfocitele mijlocii.

Scanned with OKEN Scanner

c) *Eritroblastul oxifil sau acidofil* (normoblastul ortocromatic). Acest element este cel mai ușor de identificat avînd aproximativ aspectul unui eritrocit, cu excepția prezenței nucleului.

Dimensiuni și formă. Este o celulă rotundă sau foarte ușor ovală cu un diametru de 8—10 μ.

Nucleul se reduce din ce în ce mai mult ocupînd circa 1/4 din suprafața celulei și pierzînd progresiv structura cromatiniană, pentru ca, în cele din urmă, să devină tahicromatic, omogen, asemănător cu o „pată de cerneală" de culoare violetă închis, proces cunoscut sub termenul de picnoză. În cazuri patologice nucleul poate să apară sub forme bizare (de cocardă, treflă), aspecte întîlnite frecvent în boala Biermer.

Citoplasma este oxifilă, asemănătoare cu a eritrocitelor, eventual de culoare ceva mai deschisă sau cu o tentă discret policromatofilă. La microscopul electronic se remarcă o dezagregare a poliribozomilor în monoribozomi, care sînt puternic diluați în masa de oxihemoglobină.

Frecvență. Eritroblaștii oxifili se găsesc într-o proporție de 30—35% din totalul celulelor nucleate eritrocitare (în medie 32%).

Eritroblastul oxifil nu creează dificultăți de diferențiere față de celulele din alte serii.

Sideroblaștii medulari sînt eritroblești de diferite vîrste, care conțin granule de fier neheminic, numite *siderozomi.* Granule de hemosiderină pot fi puse în evidență în eritroblești, în celulele macrofage și, mai rar, în eritrocite. Siderocitele sînt eritrocite (în mod normal reticulocite) ce conțin granule de fier nelegat de hemoglobină.

Cu ajutorul microscopului electronic s-a constatat că aceste incluzii sînt grămezi de feritină și că, în afara celor vizibile la microscopul optic, există altele mult mai mici și mai numeroase, astfel încît fiecare eritroblast și reticulocit este în realitate sideroblast sau siderocit. Începînd cu proeritroblastul, cantitatea de fier crește pe măsura maturării, pentru ca să scadă în stadiul de eritroblast oxifil. În reticulocite se întîlnesc puțin granulații de feritină; ele dispar complet în eritrocitele adulte.

Sideroblaștii pot fi normali și patologici. Sideroblaștii normali conțin siderozomi sub formă de granule fine de culoare verde închis în număr redus (1—4, rar mai mulți); ele au dimensiuni mici (0,2—0,4 μ), sînt rotunde și răspîndite neregulat în citoplasmă putînd apare uneori legate între ele printr-o rețea fină; rareori ele pot fi atașate și de partea externă a membranei. La individul sănătos numărul sideroblaștilor este cuprins între 20 și 50% din totalul eritroblaștilor, cu limite între 10 și 60% (vezi și sideroblaștii patologici, pag. 92).

d. **Citologia patologică a precursorilor eritrocitari.** Seria roșie, ca de altfel fiecare celulă a măduvei osoase, poate să prezinte devieri de la valorile normale, atît cantitative cît și calitative (225).

1) *Seria megaloblastică* reprezintă o alterare structurală a tuturor precursorilor care alcătuiesc seria roșie. Abaterea de la normal interesează nu numai talia celulară, ci și diverse alte caractere morfo-

Scanned with OKEN Scanner

logice, atît ale nucleului cît şi ale citoplasmei, expresie a tulburărilor de diviziune şi de maturaţie, care au ca rezultat final anemia.

Termenul de megaloblast a fost folosit pentru prima dată de Ehrlich (1880) pentru a desemna, atît un element normal al sîngelui embrionar, cît şi un element patologic din sîngele bolnavilor de anemie pernicioasă. Astăzi acest termen se utilizează pentru precursorii eritrocitari patologici cu morfologie caracteristică, constataţi în măduva şi sîngele periferic al acestor bolnavi (130).

Caracteristicile principale ale elementelor seriei megaloblastice sînt:

— structura fină a cromatinei nucleare, care persistă în toate stadiile de dezvoltare, fără tendinţă de a forma blocuri cromatiniene;

— asincronismul de maturare nucleo-citoplasmatic, în sensul persistenţei unei structuri „tinere" a nucleului, deşi citoplasma este „matură" (încărcată tot mai abundent cu hemoglobină), fenomen ce persistă pînă în ultimul stadiu evolutiv (megaloblast oxifil);

— anomaliile nu aparţin exclusiv seriei roşii ci sînt întîlnite şi la nivelul seriei granulocitare şi trombocitare; mai ales metamielocitele apar voluminoase (gigantocite);

— în sîngele periferic, în afară de numeroase megalocite, apar polimorfonuclearele hipersegmentate cu 4—7 nuclei (pleiocariocite);

— în seria trombocitară medulară apar megacariocite cu nuclei hipersegmentaţi, iar în sîngele periferic se constată trombocitopenie cu megatrombocite.

Mai sînt de menţionat frecvenţa crescută a mitozelor şi aspectele lor anormale. Cromozomii megaloblaştilor sînt subţiri şi lungi, cu unghiul mitotic mai ascuţit, spre deosebire de cei ai eritroblaştilor normali care sînt mai scurţi şi mai groşi. Se observă de asemenea şi alte anomalii cromozomiale (cromozomi aberanţi, picnotici etc.); întîrzierea sosirii la cei doi poli a unor cromozomi sau fragmente cromozomiale după constituirea membranei nucleare duce la apariţia corpilor Howell-Jolly.

Promegaloblastul este o celulă cu talie mai mare decît o proeritroblastului (22—30 μ), de formă rotundă sau uşor ovală. Adesea periferia citoplasmei are un contur neregulat cu una sau mai multe „urechi de cîine" („dog-ear"). Deşi raportul nucleocitoplasmatic rămîne supraunitar, citoplasma este mai abundentă decît în celulele normale. Nucleul, situat mai excentric, prezintă o reţea cromatiniană cu ochiuri foarte fine, ce conţine 1—4 nucleoli cu un diametru de 1—2 μ, mai slab colorati. Citoplasma are aceeaşi nuanţă ca şi a proeritroblaştilor.

Megaloblastul bazofil are un diametru de 20—25 μ. Raportul nucleocitoplasmatic, atît la acest element cît şi la cele din stadiile următoare, este şi mai mult în favoarea citoplasmei. Nucleul, deşi scade în volum şi îşi pierde nucleolii, păstrează încă caracterele de „tinereţe", cu cromatina în reţea fină, dar începe să prezinte densificări perlate pe fondul mai clar al restului substanţei nucleare. Uneori aceste granule se dispun în grupuri mici, formînd „cariozomi". Citoplasma este intens bazofilă, pe alocuri cu zone mai clare. Acest stadiu are un potenţial mitotic mare; există însă anomalii cromozomiale, mitoze poliploide.

Scanned with OKEN Scanner

Megaloblastul policromatofil este stadiul cel mai tipic pentru diagnosticul de anemie megaloblastică. Talia lui este de 15—20 μ. Raportul nucleo-citoplasmatic se modifică și mai mult în favoarea citoplasmei prin condensarea nucleului. Asincronismul de maturare nucleo-citoplasmatic apare aici și mai evident. Condensările nucleare sînt mai mari și net delimitate față de fondul clar al restului substanței nucleare (aspect de tablă de șah). Pe măsura maturării, aceste condensări tind să se contopească, iar nucleul se deformează. Conturul nucleului este uneori neregulat, alteori se constată existența unor nuclei accesorii, suprapuși peste nucleul principal. Aceste bizarerii nucleare pot fi prezente atît în stadiul policromatofil, cît și în cel oxifil. Repartizarea hemoglobinei în citoplasmă pare să se facă neregulat, realizînd o nuanță de culoare greu de definit, pe care se suprapun zone de culoare roz.

Megaloblastul oxifil este o celulă cu talia de 12—15 μ sau și mai mult; conturul rotund se modifică pe măsura maturării. Nucleul este excentric, adesea neregulat, chiar multilobulat (în formă de treflă sau cu alte aspecte bizare); deși picnotic, poate să mai păstreze o anumită structură cromatiniană. În afara nucleului principal pot apare „sateliți" nucleari sub forma corpilor Howell-Jolly, frecvent întîlniți în acest tip de anemie. Alteori pot fi observați nuclei „accesorii" suprapuși peste nucleul principal. Citoplasma este acidofilă, puternic încărcată cu hemoglobină. Prezența megaloblastozei nu este niciodată totală în măduva osoasă; aproape totdeauna există și o populație normoblastică, precum și celule megaloblastice cu caractere intermediare.

Megaloblaștii apar aproape exclusiv ca urmare a unui deficit de vitamină B_{12} sau de acid folic. Absența lor produce o serie de perturbări metabolice, dintre care cea mai importantă este tulburarea sintezei ADN, ceea ce duce, îndeosebi, la tulburarea desfășurării diviziunilor heteroplastice. Prin aceasta, în măduvă se acumulează eritroblești cu nuclei tineri dar a căror citoplasmă se încarcă totuși cu hemoglobină.

Macroblaștii reprezintă aspecte morfologice intermediare între seria normoblastică și cea megaloblastică. Semnificația lor nu este atît de bine înțeleasă ca aceea a megaloblaștilor. Din punct de vedere morfologic ei se apropie uneori mai mult de normoblești, alteori de megaloblești, putîndu-se găsi toate formele intermediare între cele două tipuri de celule descrise. Precursorii eritrocitari mai voluminoși (fără să fie megaloblești) pot fi observați în suferințele parenchimului hepatic (ciroze), megaloblastoza adevărată neapărînd decît foarte rar. În boala Biermer „decapitată" prin administrarea nerațională de „fortifiante" (polivitamine cu conținut de vitamină B_{12}), pot fi observate pe frotiul medular forme intermediare care creează dificultăți serioase de diagnostic.

2) *Eritroblești hemoglobinoprivi.* În anemiile hipocrome, din cauza tulburărilor de sinteză a hemoglobinei, apar aspecte caracteristice ale precursorilor eritrocitari. Frotiul medular prezintă, pe ansamblu, o creștere a eritropoiezei cu predominanța formelor tinere, mai ales a eritroblaștilor bazofili. Din punct de vedere citologic se constată și aici un asincronism de maturare nucleo-citoplasmatic, dar în sens invers, cu maturare mai rapidă a nucleului decît a citoplasmei, care rămîne bazofilă. Anomaliile eritroblastice sînt vizibile cel mai bine în stadiul policro-

Scanned with OKEN Scanner

matofil. Aceste elemente sînt mai mici decît echivalentele lor normoblastice, citoplasma este mai redusă în jurul nucleului, cu contur neregulat (margini zdrenţuite). Încărcarea cu hemoglobină fiind tulburată, coloraţia citoplasmei apare inegală, mai bazofilă spre periferie.

3) *Anaplazii eritroblastice.* În unele afecţiuni, de exemplu în eritremie, anemie diseritropoietică congenitală* etc., eritroblaştii se caracterizează printr-o diseritropoieză accentuată, cu morfologie celulară variabilă, expresie a unor tulburări grave de maturaţie (vezi şi fig. 2-19).

Mărimea celulelor este variabilă; uneori apar eritroblaşti giganţi. Adesea pot fi întîlnite forme megaloblastoide greu de diferenţiat de megaloblaştii din anemia pernicioasă, încît se poate ajunge şi la erori de diagnostic cu anemia Biermer. Conturul celular este adesea neregulat, polilobat sau cu prelungiri citoplasmatice. *Nucleul* apare cel mai frecvent cu o maturare întîrziată faţă de citoplasmă; el poate fi adesea poliploid, uneori polisegmentat. *Citoplasma* prezintă în multe cazuri o bazofilie anormală şi aspecte de vacuolizare. *Mitozele* apar în număr mult crescut faţă de normal, încît situaţia poate fi interpretată, uneori greşit, ca un efort de regenerare medulară. Tulburările de diviziune se traduc sub formă de figuri mitotice multipolare, precum şi prin frecvente şi variate atipii cromozomiale.

Modificările celorlalte serii mieloice apar neînsemnate faţă de cele ale seriei roşii şi de hiperplazia eritroblastică a cărei proporţie faţă de seria granulocitară este adesea inversată, putînd ajunge chiar la 90% din totalul cariocitelor.

4) *Sideroblaştii patologici* sînt eritroblaşti care prezintă o tulburare a metabolismului fierului, avînd ca urmare apariţia în număr mare a unor siderozomi cu granulaţii mari (3—4 μ), sau sub formă de conglomerate aşezate în arc de cerc, sau în cerc complet, în jurul nucleului; ei pot reprezenta pînă la 100% din eritroblaştii medulari. La microscopul electronic, în sideroblaştii patologici incluziile nu apar ca mici particule răspîndite difuz în citoplasmă, ci se aglomerează în mitocondrii, a căror structură normală dispare sub aceste depozite în formă de bulgări. Cum mitocondriile se găsesc în număr mare în jurul nucleului, depozitele de fier pot să confere sideroblaştilor o imagine în „coroană" *(ring sideroblast).* Între numărul sideroblaştilor, prezenţa siderozomilor cu granulaţii grosolane şi nivelul sideremiei, există o corelaţie strînsă.

Creşterea numărului de sideroblaşti apare în afecţiuni numeroase care au însă în comun o tulburare a sintezei hemoglobinei; fierul intrat în celule, neputînd fi utilizat, se acumulează în exces, iar pe de altă parte, plasma sanguină este hipersideremică, în timp ce eritrocitele din circulaţie apar hipocrome. Creşteri mari (+++) se întîlnesc în *anemiile hipocrome hipersideremice (sideroacrestice) (crestein* cuv. gr.=a utiliza). Majoritatea *anemiilor hemolitice* (ca talasemia) se însoţesc de creşteri importante ale sideroblaştilor (++). În *anemia megaloblastică,* bolile din sindromul *mieloproliferativ,* dar mai ales în *hemocromatoză,* numărul si-

---

* Una din manifestări este cunoscută sub denumirea de HEMPAS (hereditary erythroblastic multinuclearity with positive acidified serum test).

Scanned with OKEN Scanner

deroblaştilor este crescut. Deficitul de vitamină B_6, care duce la o anemie cu răspuns favorabil la piridoxină, precum şi anemiile din unele intoxicaţii (saturnism) sau cele induse de unele medicamente (izoniazida, cicloserina etc.) pot produce şi ele tulburări în una din etapele de sinteză a hemului, cu utilizare deficitară a fierului.

Scăderea numărului de sideroblaşti sub 10% (putînd merge pînă la dispariţia lor din măduvă) este o constatare obişnuită în anemia hipocromă feriprivă. În cele două tipuri de anemii hipocrome (sideropenică şi sideroacrestică), examinarea sideroblaştilor dă rezultate contrare, a căror valoare diagnostică este mare. Corectarea hipocromiei prin feroterapie duce la reapariţia sideroblaştilor, fenomen ce precede normalizarea valorilor eritrocitare. În anemiile din infecţii şi în anemiile din tumori carenţa aparentă a fierului este provocată de blocarea lui în celulele SRH. În timp ce în mod normal există raporturi funcţionale optime între fierul eritroblastic şi cel din celulele macrofage medulare, în aceste stări morbide, trecerea fierului spre sectorul eritroblastic este îngreunată.

Indicele sideroblastic urmăreşte evaluarea gradului de încărcare cu fier a eritroblaştilor. Determinarea lui constă în examinarea pe frotiul medular a unui număr de 100 de eritroblaşti din toate stadiile de evoluţie, care se încadrează, după cantitatea de fier colorabil, în următoarele subgrupe graduale: 0=granulaţii absente; +=granulaţii fine şi difuz dispersate; ++=granulaţii numeroase şi mari; +++=granulaţii grosolane, dispuse în coroană. În mod normal apar numai granulaţiile fine şi difuz răspîndite care se constată într-o proporţie de 30—60% din eritroblaşti. Bowmann (1961) propune să se ia în consideraţie numai formele inelare ale sideroblaştilor patologici. Dacă numărul de sideroblaşti este crescut şi se găsesc siderozomi cu granule mari, se poate conchide cu siguranţă asupra creşterii fierului extraeritroblastic. Concluzia inversă însă nu este valabilă, de exemplu în infecţiile cronice, cu toată tezaurizarea crescută de fier în reticulul măduvei osoase, numărul sideroblaştilor este scăzut. În afară de numărul de sideroblaşti, pentru diagnostic poate fi importantă şi interpretarea calităţii particulelor (număr, mărime, formă, mod de repartizare etc.).

B. DINAMICA ERITROPOIEZEI

Un ţesut este alcătuit dintr-un ansamblu de celule care îndeplinesc aceeaşi funcţie sau funcţii apropiate. Unele ţesuturi şi organe sînt în permanentă proliferare, de la naştere pînă la moarte, ca ţesutul hematopoietic, celulele tractului digestiv, ale ficatului, rinichiului etc. Ritmul de formare a elementelor sanguine din măduva hematopoietică este foarte rapid. Alte celule, ca celulele sistemului nervos, celulele musculare şi altele, pierd capacitatea de proliferare încă din momentul diferenţierii lor embrionare; ele se reduc numeric treptat pe măsura înaintării în vîrstă.

Scanned with OKEN Scanner

1. ŢESUTUL HEMATOPOIETIC, COMPONENTĂ A „SRH"

Ontogenetic cea mai veche activitate hematopoietică este eritropoieza. Chiar şi organele care nu produc în viaţa extrauterină eritrocite, ca ficatul, splina, timusul, ganglionii limfatici etc., formează, la începutul activităţii lor, eritrocite primitive. Spre sfîrşitul etapei intrauterine toate funcţiile hematopoietice converg către măduva osoasă. În afară de hematopoieză (eritro-, mielo- şi trombocitopoieză) măduva osoasă mai îndeplineşte un rol important în fagocitoză, prin intermediul celulelor macrofage, precum şi în procesul imun, prin intermediul celulelor limfoide şi plasmocitare (139).

Celulele care asigură hematopoieza sînt celule mezenchimale; ele provin din mezodermul primitiv. Cele trei foiţe primitive din care derivă vieţuitoarele din regnul animal se intrică atît de mult în cursul ontogenezei încît pot fi întîlnite peste tot în organism. Celulele care derivă din mezodermul primitiv au fost grupate într-un sistem cunoscut, cel mai frecvent, sub denumirile de sistem reticulohistiocitar (SRH) sau sistem reticulo-endotelial (SRE). În anumite ţesuturi şi organe, aceste celule au o concentrare maximă, ca măduva osoasă, sistemul limfoid (ganglionii limfatici, splină, timus), în timp ce în altele sînt mai slab reprezentate (interstiţii viscerale, seroase, ţesut conjunctiv lax, hipoderm etc.). Este greu de formulat o definiţie convenabilă a acestui sistem, avînd în vedere, în primul rînd, dificultăţile pe care le ridică delimitarea lui precisă. În mod clasic SRH este descris sub trei aspecte: embriologic, morfologic şi fiziologic. Fiind un sistem ubicuitar, heterogen morfologic, majoritatea autorilor preferă să-l definească mai mult prin proprietăţile sale fiziologice decît prin caracterele morfologice, iar întrucît nu sînt încă „catalogate" cu precizie nici funcţiile tuturor celulelor care intră în componenţa lui şi nici mecanismele care reglează diferenţierea acestora, mai dăinuie numeroase confuzii, iar nomenclatura este şi ea destul de variată. Între poziţiile extreme, ca acelea care tind să-i desfiinţeze existenţa ca unitate şi altele care îi recunosc o unitate, se situează o mare varietate de concepţii despre SRH (18, 271); cercetările mai noi converg însă din ce în ce mai mult spre o reconsiderare a acestei concepţii postulată de Aschoff în 1913. Din acest sistem — în care celula „reticulară" avea un rol complex — s-au desprins celulele hematopoietice mieloide şi limfoide. Celula reticulară trebuie văzută ca o celulă a ţesutului de susţinere scheletală (celule osoase, cartilaginoase etc.) sau ca o celulă de susţinere din organe (celule gliale, trama conjunctivă a organelor glandulare etc.), şi nu ca o celulă sanguină.

Principalele teorii asupra hematopoiezei. Conceptele care au căutat să explice provenienţa diferitelor serii sanguine şi tisulare au dat naştere, timp de cîteva decenii în prima jumătate a secolului nostru, unor controverse între cei mai de frunte hematologi ai epocii. Ele au avut ca rezultat acumularea unor date preţioase în legătură cu hematopoieza. Deşi nici pînă în prezent această problemă nu este definitiv tranşată, polemica pe această temă a căzut pe un plan secundar întrucît interesul cercetărilor s-a deplasat către alte probleme de importanţă mult mai mare, de exemplu cele de genetică, biofizică celulară etc. (228, 248).

După ipotezele emise de diferitele şcoli, teoriile asupra hematopoiezei se pot împărţi în următoarele:

Teoria unicistă (sau monofiletică), emisă de Maximov, Ferrata, Pappenheim şi alţii susţine că toate celulele sanguine provin dintr-o singură celulă suşă omnipotentă. Cercetările din ultimii ani au actualizat această concepţie pe baza date-

lor de genetică, a experienţelor de colonizare de celule etc. efectuate în ultimele 2—3 decenii.

Teoria dualistă, emisă de Ehrlich, apoi de Naegeli, Rohr şi alţii, postulează origini diferite pentru ţesutul mieloid şi pentru cel limfoid.

Teoria trialistă, emisă de Schilling şi susţinută de alţi hematologi, pretinde că celula reticulară nediferenţiată este aptă să se diferenţieze în trei direcţii hematopoietice: mielocitare, monocitare şi limfocitare.

Teoria polifiletică (Undritz şi alţii) consideră că elementele sanguine nu derivă din una, două sau trei celule susă, ci ar exista pentru fiecare tip de celulă matură un precursor diferit (eritroblast, megaloblast, neutrofiloblast, eozinofiloblast, bazofiloblast, monocitoblast etc.).

Aceasta a fost situaţia primelor decenii ale secolului nostru cînd hematologii, de formaţie predominant morfologică, căutau să sistematizeze diferitele celule ale ţesutului sanguin, după mărime, formă, culoare etc., la fel ca naturaliştii care catalogau plantele, fluturii, viermii etc., după criterii predominant morfologice. Astăzi hematologia cunoaşte o fază dinamică, funcţională, fiecare celulă este un mesager al unor funcţii fiziologice sau patologice legate între ele prin numeroase relee. Criteriile morfologice clasice sînt nesatisfăcătoare pentru stabilirea relaţiilor dintre structură şi funcţie. Cunoştinţele actuale de genetică moleculară, tehnicile perfecţionate de culturi celulare şi de marcare a celulelor cu izotopi radioactivi pot fi considerate un început în rezolvarea problemei diferenţierii celulare.

2. FUNCŢIILE MEDULARE (ÎNMULŢIREA, MATURAREA ŞI DIABAZA)

Celulele tinere manifestă, în cursul vieţii lor, două tendinţe distincte: tendinţa la diviziune, care duce la proliferarea seriei respective şi tendinţa la diferenţiere, care creează suportul activităţii funcţionale specifice. Patologia sîngelui este, în cea mai mare parte, o patologie a proliferării şi diferenţierii, deci a regenerării sanguine. Dacă la nivelul unor organe o celulă funcţională dă naştere altei celule funcţionale (de exemplu, un hepatocit dă naştere la două hepatocite), pentru formarea unui eritrocit este necesar să fie parcursă o întreagă succesiune de etape ontogenetice, de la proeritroblast la eritrocit.

Hematopoieza cuprinde 3 compartimente de dezvoltare:

— *compartimentul celular nediferenţiat*, cu o populaţie medulară apreciată la aproximativ 120 miliarde de celule omnipotente sau orientate deja spre o linie sanguină. Acest compartiment are rolul de a menţine homeostazia elementelor figurate sanguine printr-un sistem de autoreproducere (24). În condiţii normale, circa 10% din aceste celule (aproximativ 12 miliarde) se angajează pe calea diferenţierii, intrînd astfel în compartimentul următor;

— *compartimentul celular de proliferare — maturare* cuprinde cele circa 12 miliarde amintite care se multiplică de 3—6 ori, dînd naştere unui număr de 400—800 de miliarde de celule; din acestea, circa 20 de miliarde reprezintă producţia zilnică de eritrocite (circa 20 ml), cifră care compensează distrucţia eritrocitară;

Scanned with OKEN Scanner

— *compartimentul celular din sîngele periferic* cuprinde circa 2 500 ml din care eritrocitele ocupă un volum de circa 500 de ori mai mare decît celelalte elemente celulare sanguine; ca număr, acest volum corespunde cu aproximativ 25 000 miliarde eritrocite (fig. 2-7).

Formarea celulelor sanguine presupune trei funcţii de bază cuplate ale măduvei osoase: *multiplicarea, diferenţierea* şi *diabaza* (24, 143, 234, 313) (fig. 2-8).

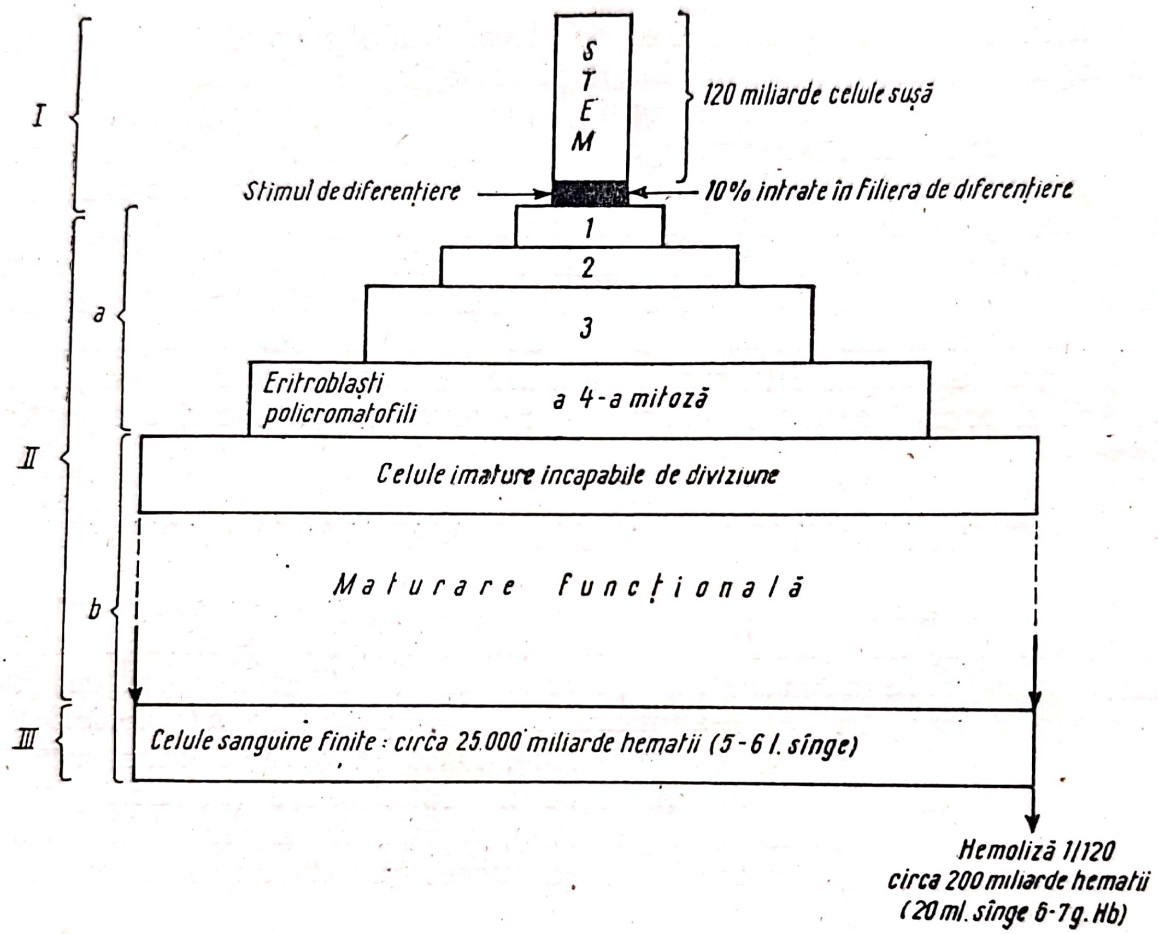


Fig. 2-7. Reprezentare figurativă a eritropoiezei.

Acest mecanism evolutiv poate fi comparat cu o piramidă; în vîrful ei se află celulele stem, iar la bază celulele adulte: I. Compartimentul celulelor stem (în negru, proporţia de elemente angajate pe calea diferenţierii). II. Compartimentul celulelor în curs de multiplicare-maturare: a) celule diferenţiate imature (proeritroblaşti, eritroblaşti bazofili şi policromatofili tineri), capabile de diviziune (1, 2, 3, 4=numărul de mitoze); b) celule aflate într-un grad avansat de diferenţiere şi maturare, dar fără o activitate mitotică (eritroblaşti policromatofili puternic încărcaţi cu hemoglobină, eritroblaşti oxifili şi reticulocite). III. Compartimentul celulelor mature din sîngele circulant. Întrucît nici perioada mitotică, nici cea intermitotică nu pot fi mult scurtate, creşterea eritropoiezei are loc pe seama creşterii ratei de celule stem angajate în procesul de proliferare-diferenţiere, substratul anatomic fiind hiperplazia eritropoiezei pe seama măduvei galbene.

a. **Multiplicarea precursorilor eritrocitari.** Celulele fiice care rezultă din diviziunea unor celule mai tinere, posedînd acelaşi material informativ genetic, pot evolua în mod identic sau diferit (fig. 2-9). Mecanismul selecţiei care orientează unele celule spre diferenţiere, oprind diviziunile

după ce a fost atins un anumit stadiu al diferenţierii, în timp ce alte celule îşi păstrează acest potenţial pentru alte stimulări, nu este cunoscut.

Se admite că multiplicarea poate fi: *homoplastică, heteroplastică* şi *hemiplastică* (sau homo-heteroplastică); în trecut s-a presupus şi existenţa „dediferenţierii".

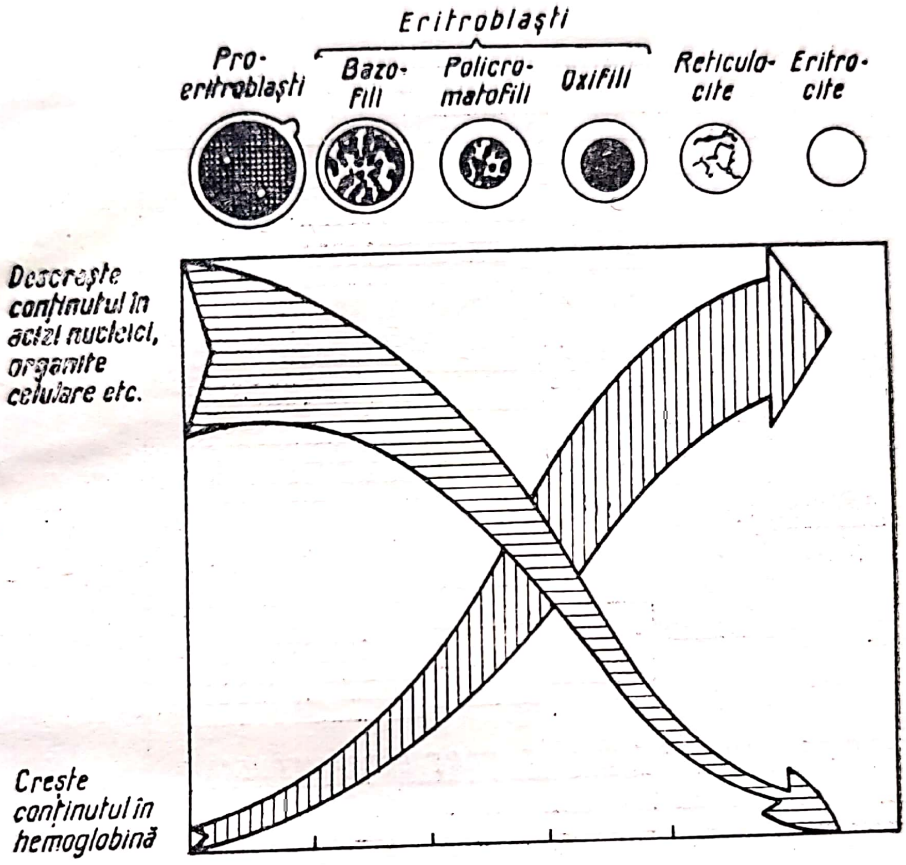


Fig. 2-8. Tendinţele histochimice ale precursorilor eritrocitari în diferite etape de dezvoltare.

Alternanţa cantitativă a constituenţilor celulari (acizi nucleici la un pol şi hemoglobină la altul) este invers proporţională în cursul procesului de maturaţie celulară (inversare a stărilor). Pe măsură ce nucleul eritroblaştilor se ratatinează, scad şi interrelaţiile metabolice dintre nucleu şi citoplasmă, reducîndu-se cantitatea de organite şi substanţa fundamentală citoplasmatică. Încărcarea cu hemoglobină începe încă în stadiul de proeritroblast cu 1—10 γγ Hb conţinută pe celulă, progresează în eritroblaştii bazofili (10—15 γγ), iar în cei policromatofili şi acidofili este de 15—25 γγ; se apropie de saturare în reticulocit (25—30 γγ) şi este completă în eritrocit (32—34 γγ).

Pînă în prezent nu s-a putut alcătui un model perfect al eritropoiezei. Există dovezi că mitozele nu se desfăşoară totdeauna după un model strict exponenţial: 1—2—4—8 etc.; pe această schemă de bază se grefează, după necesităţi, sau ca o consecinţă a unor dereglări patologice, diviziuni asimetrice, precum şi salturi peste 1—2 diviziuni (fig. 2-10). Oricare ar fi mecanismul de proliferare, cînd o celulă se diferenţiază în proeritroblast, „locul vacant" este preluat de o altă celulă stem, prin înmulţire homoplastică (234).

Spre deosebire de unele organisme sau țesuturi, în care numărul celulelor este în continuă creștere (embrion, celule din culturi, tumori maligne), la individul adult fiecare țesut are un volum staționar, format dintr-o populație celulară relativ stabilă ca număr. Această stabilitate este menținută de echilibrul care există între transformarea grasă și ex-

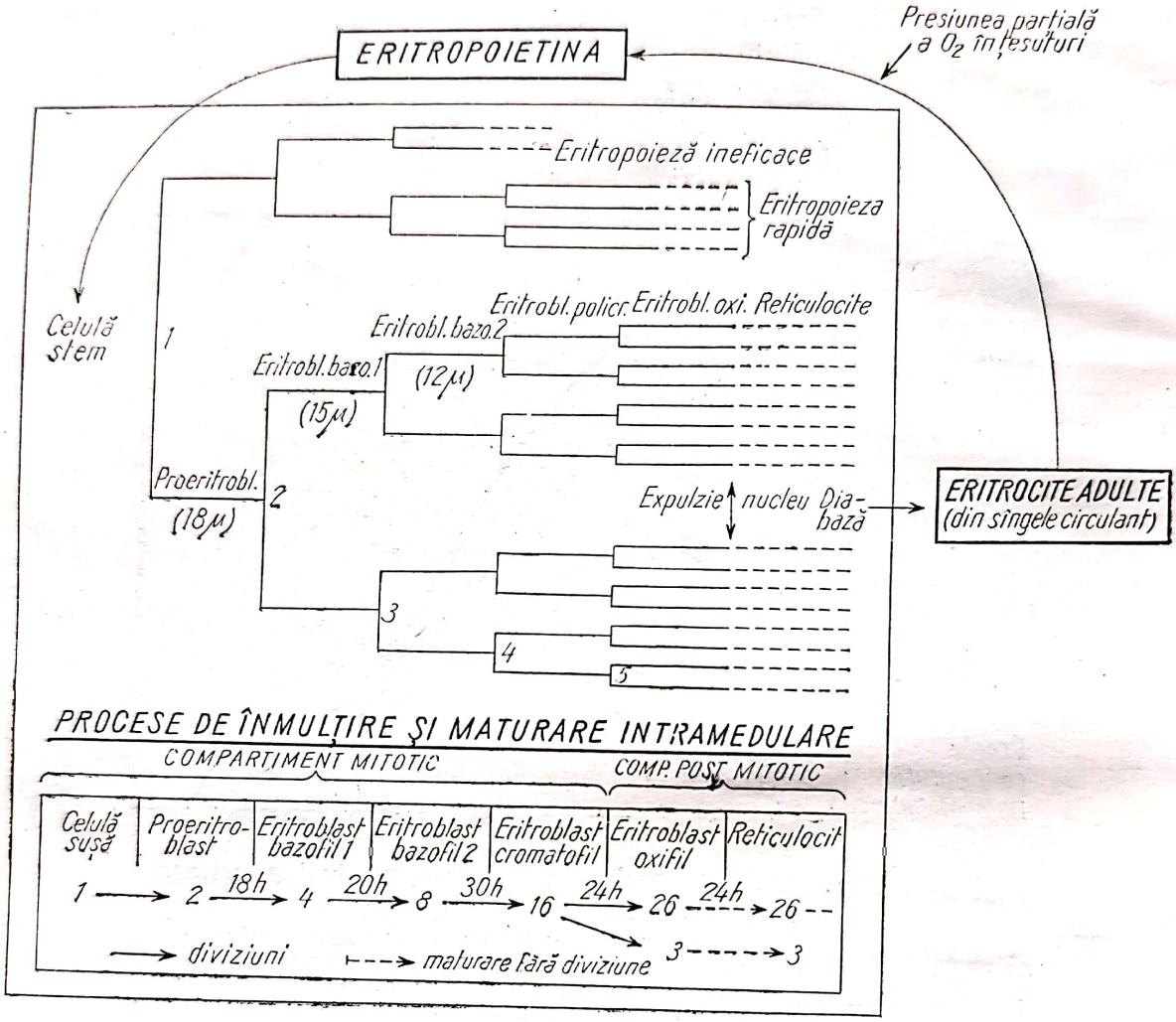


Fig. 2-9. Model de eritropoieză (modificat după Laitha, Nay și colab., 1970). O celulă stem dă naștere, prin diferențiere, la 2 proeritroblești, care, după 4—5 diviziuni, devin eritroblești policromatofili avansați (incapabili de o nouă mitoză). Eritropoietina acționează asupra celulei stem, prin intermediul presiunii parțiale a O_2 la nivelul țesuturilor. Produsul final (eritrocitul transportor de oxigen) acționează asupra locului unde debutează întregul lanț metabolic (celula stem).

pansiunea celulară. De exemplu, în numai 48 de ore măduva grasă se transformă în totalitate în măduvă roșie (318, 324).

1) *Multiplicarea homoplastică* (sau diviziunea egală) are ca rezultat două celule asemănătoare, atît între ele, cît și cu celula mamă. Inițial celulele fiice au talia mai redusă, dar ulterior cresc, devenind identice cu celula mamă. Acest fel de înmulțire este de tip regenerator (de autoreînnoire). Diviziunea homoplastică apare predominant la nivelul celulelor nediferențiate sau la un nivel minim de diferențiere.

2) *Multiplicarea heteroplastică* (sau diferențială) duce la apariția unor celule diferite morfologic și fiziologic față de celula mamă. Prin această diviziune, concomitent cu multiplicarea, apare o treaptă superioară de maturație celulară; aceste diviziuni mai sînt numite și maturizante.

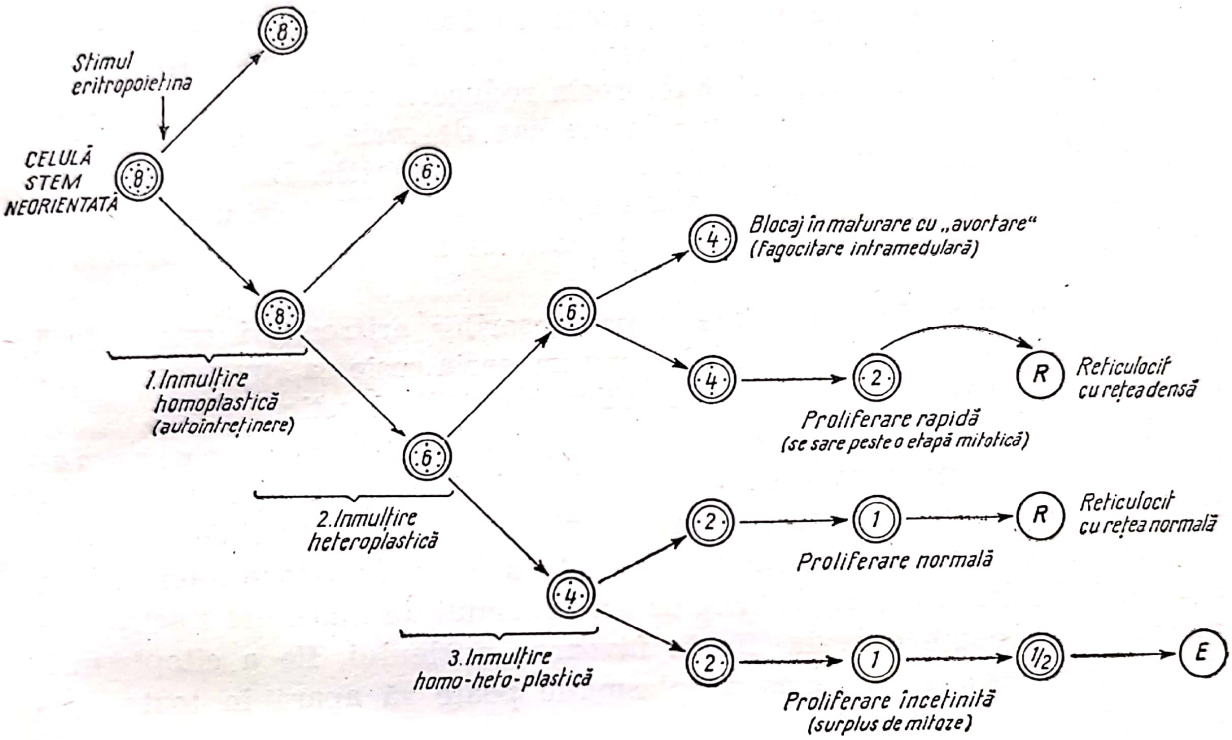


Fig. 2-10. Reprezentare schematică a modalităților de înmulțire și maturare a precursorilor eritrocitari.

În stînga, celula stem, care a primit stimulul de sinteză eritrocitară, se transformă în două celule stem fiice, una pentru a menține sursa de celule omnipotente și alta pentru eritropoieză. În caz de surplus eritrocitar (ex. transfuzii), celulele foarte tinere, angajate în procesul de diferențiere, nu-și continuă proliferarea. În caz de necesitate eritrocitară crescută în periferie, eritropoieza devine rapidă (se reduce numărul de mitoze), sărindu-se peste unele etape intermediare, iar în periferie apar reticulocite cu rețea granulofilamentoasă densă ce persistă mai multe zile în circulația periferică. Cînd surplusul celular se menține (persistența transfuziilor), celulele aflate într-un grad avansat de maturare, fie că-și încetinesc maturarea (maturare prelungită), fie că și-o sistează (eritroblești „avortați"). Chiar în condiții normale, dacă necesitățile periferiei nu cresc pe parcurs, 10—15% din totalul eritroblaștilor sînt fagocitați în diferite stadii evolutive.

Numărul de puncte și cifrele sînt reprezentări ale cantității de acizi nucleici în celulă.

3) *Multiplicarea hemiplastică* (sau homo-heteroplastică) este un tip de diviziune celulară asimetric; prin mitoză rezultă inițial două celule fiice identice, însă în timp ce una din ele crește și devine asemănătoare cu celula mamă, cealaltă se diferențiază: înmulțirea este în acest caz de tip hemiregenerator, dar totodată și hemimaturizant.

4) *Multiplicarea cu „dediferențiere"* („întinerire") s-a crezut că ar apare într-un stadiu incipient de diferențiere. În această concepție neconfirmată, celulele ar putea evolua, spre o „reîntinerire"

contribuindu-se la menținerea intactă a stocului de celule sușă dacă condițiile periferiei au fost ameliorate.

Cariometria. Măsurătorile volumetrice ale nucleului eritroblaștilor datează de circa jumătate de secol. Jacobi (1925), Leibetseder (1948), Weicker (1956), Bont și colab. (1959) au propus gruparea nucleului precursorilor seriei roșii în 5 clase de mărime. Proeritroblastul, cu un diametru mediu de circa 18 μ, a fost notat cu indicele K_2, iar generațiile următoare de eritroblești au fost desemnate cu indicii K_1, $K_{1/2}$, $K_{1/4}$, $K_{1/8}$, Clasele de mărime nucleară sînt expresia reducerii volumului nuclear în cursul diviziunilor eritroblaștilor. Celula cap de serie a seriei roșii, notată cu inițiala K_2, s-ar înmulți întîi homo-heteroplastic. Din acest stadiu ar urma cele 3 diviziuni heteroplastice ($K_{1/2}$, $K_{1/4}$, $K_{1/8}$) în urma cărora ar rezulta 2, 4 apoi 8 celule, într-un grad tot mai avansat de maturare (143, 324).

b. **Maturarea fără diviziune a precursorilor eritrocitari** este o fază mai avansată de dezvoltare celulară; pentru seria roșie ea cuprinde eritroblaștii policromatofili avansați, eritroblaștii oxifili și reticulocitele.

1) *Sincronismul de maturare nucleo-citoplasmatic.* În mod normal maturarea nucleului se desfășoară paralel cu maturarea citoplasmei: o citoplasmă tînără coexistă cu un nucleu tînăr, iar unei citoplasme mature îi corespunde un nucleu cu o funcționalitate redusă sau nulă. În diferite stări patologice sincronismul de maturare nucleocitoplasmatic se poate deregla, fie în favoarea nucleului, fie a citoplasmei. Asincronism evolutiv nucleo-citoplasmatic poate să apară în toate anemiile grave.

2) *Expulzia nucleului.* Problema dispariției nucleului în eritroblastul oxifil a fost mult timp nelămurită. Au existat trei presupuneri de bază: cariorexa sau fragmentarea nucleului, carioliza sau „topirea" intracitoplasmatică a nucleului și expulzia nucleară. Astăzi se știe că fenomenul care eliberează eritroblastul oxifil de nucleu, cel puțin în condiții fiziologice, este expulzia. Microcinematografia a evidențiat că eritroblastul oxifil, suficient de matur pentru expulzie, prezintă, la un moment dat, mișcări foarte ample cu deformări petaloide ale conturului celular, după care urmează expulzia nucleului aflat în una din excrescențele citoplasmatice. Expulzia propriu-zisă durează circa 10 minute (17) (fig. 2-11).

Nucleul expulzat conține în jurul lui mici cantități de citoplasmă cu organite citoplasmatice, precum și o cantitate de hemoglobină.

Celulele macrofage, care alimentează cuibul de eritroblești, fagocitează nucleii liberi de eritroblești oxifili, foarte curînd după expulzia lor. Alteori, concomitent cu desprinderea eritroblastului oxifil din cuibul de eritroblești, se produce și fagocitoza nucleului expulzat de către macrofagul care a alimentat cu fier eritroblastul (fig. 2-12).

Scanned with OKEN Scanner

c. **Diabaza***. Trecerea eritrocitelor (respectiv a reticulocitelor) în circulație se face prin mișcări active, asemănătoare procesului de diapedeză leucocitară. Pînă recent s-a crezut că eritrocitele, neavînd mișcări proprii, nu pot să se strecoare activ printre „dalele" elastice ale celulelor endote-

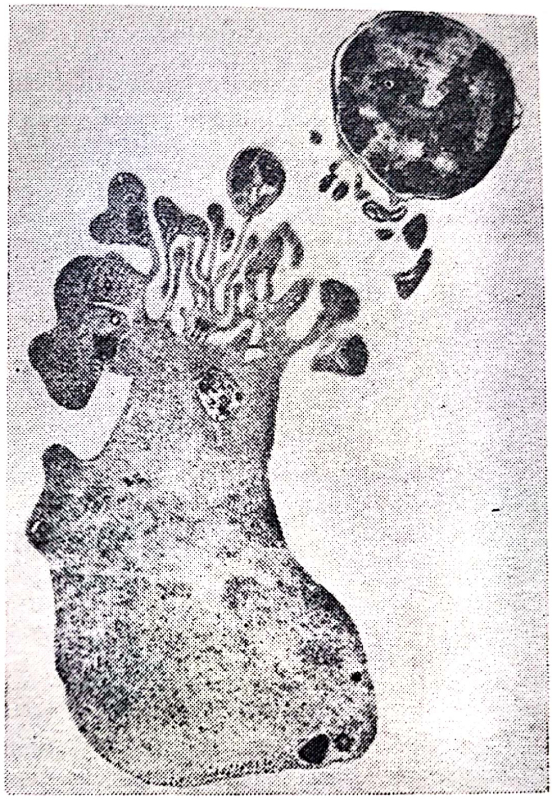


Fig. 2-11. Expulzia nucleară (după M. Bessis, 1966).

În figură este surprins un eritroblast imediat după expulzia nucleului. De remarcat o strangulare citoplasmatică în zona perinucleară, precum și aspectul dantelat al suprafeței ce corespunde mișcărilor celulare. Odată cu expulzia nucleului se produce și o mică pierdere de hemoglobină. În citoplasma reticulocitului se remarcă o abundență de organite celulare. (Microscopie electronică; mărire 30 000 ×).

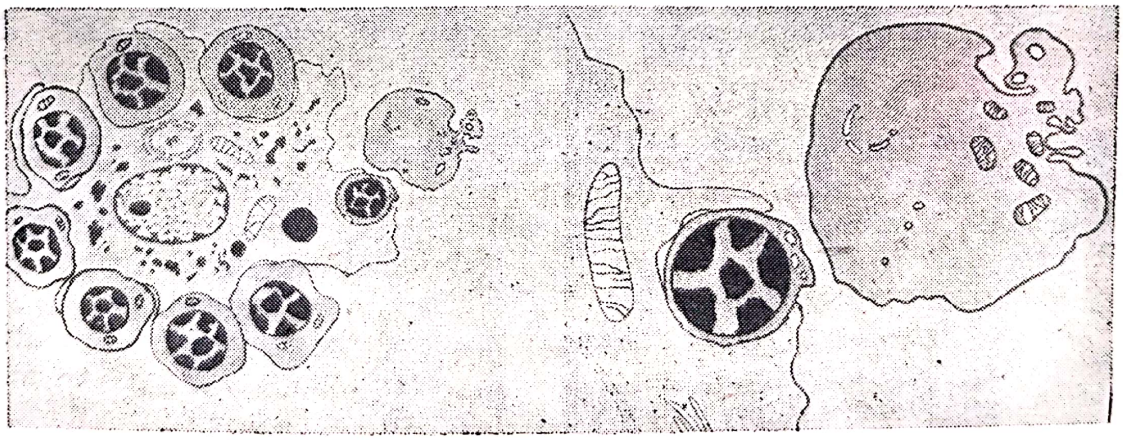


Fig. 2-12. Expulzarea și fagocitarea simultană a nucleului unui eritroblast (după M. Bessis, 1973).

La *stînga* o insulă de eritroblești; la *dreapta*, detalierea aceleiași imagini în care se arată că unul din eritroblești (din extremitatea dreaptă), concomitent cu desprinderea lui din acest cuib, își expulzează nucleul direct în cavitatea macrofagului care-l fagocitează, eritroblastul devenind reticulocit.

* Cuv. gr. *diabao*=traversare (*dia*=prin, *bainein*=a trece).

Scanned with OKEN Scanner

liale care alcătuiesc peretele endoteliului capilar sau sinusal şi ar părăsi măduva, împinse din urmă, de însăşi proliferarea celulară continuă.

Prin microcinematografie s-a vizualizat cum reticulocitul emite un pseudopod, pe care-l strecoară printr-o mică fantă formată la nivelul limitei dintre două celule endoteliale. Această prelungire devine din ce în

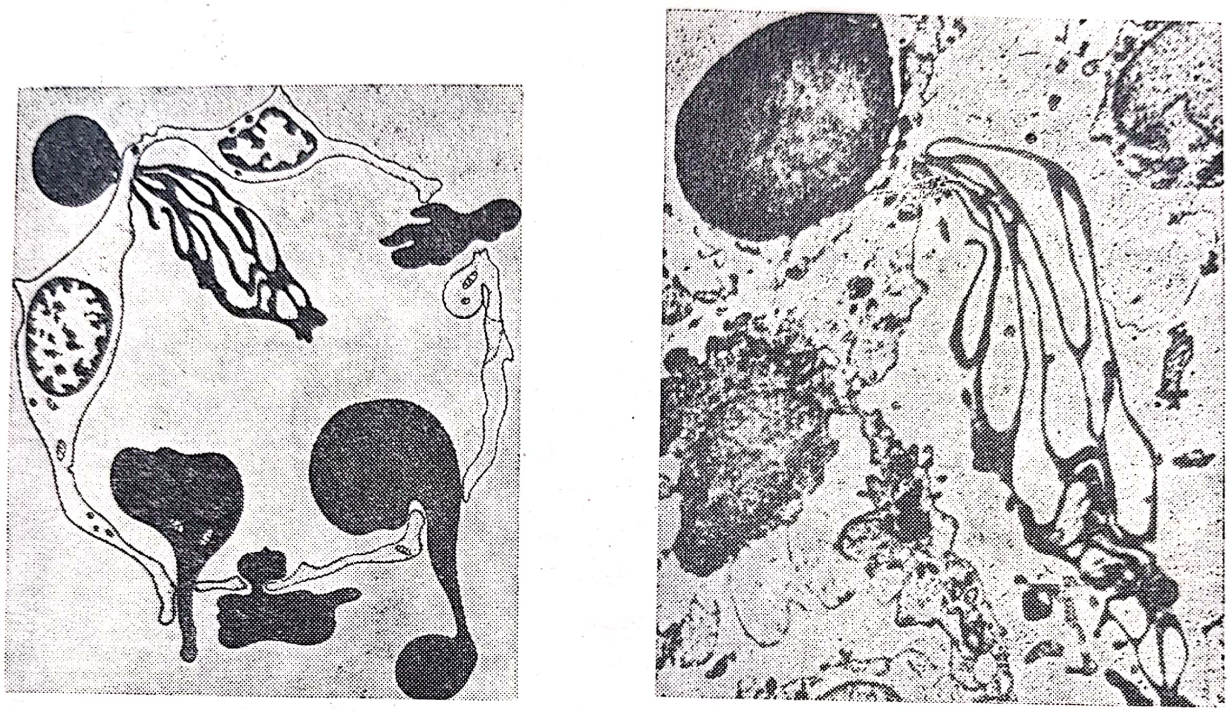


Fig. 2-13. Trecerea în circulaţie a eritrocitelor tinere (după M. Bessis, 1966).
Stînga: reprezentare schematică a unui capilar sanguin în secţiune transversală prin care sînt în curs de diapedeză 5 elemente: 3 reticulocite şi 2 eritroblaşti oxifili; aceştia din urmă, concomitent cu pasajul, îşi expulzează şi nucleul. Toate celulele sînt puternic deformate. *Dreapta:* perete capilar prin care trece un eritroblast matur, care îşi lasă nucleul afară (acelaşi din partea de sus-stînga a desenului precedent). Microscopie electronică într-un caz de anemie hemolitică; mărire de 20 000 ×).

ce mai voluminoasă, pînă cuprinde întreaga masă a celulei, după care reticulocitul îşi reia forma, mai mult sau mai puţin rotundă, de partea cealaltă a barierei peretelui sinusal. Reticulocitul care nu a traversat în timp util peretele endoteliului vascular, se maturează în „parenchim", pierzîndu-şi capacitatea de diapedeză şi rămîne blocat la acest nivel. În calitate de eritrocit, el nu-şi poate îndeplini, extrasinusal, funcţia respiratorie, fiind fagocitat de către celulele macrofage. Aceste eritrocite „sechestrate" intră, de asemenea, în cota eritropoiezei ineficiente (fig. 2-13).

În cazuri patologice diabaza poate fi tulburată, fie prin blocarea exagerată a celulelor *in situ*, fie prin trecerea unor celule imature în circulaţie. În unele proliferări medulare masive, măduva nu este în stare să descarce în circulaţie nici măcar celulele sanguine mature care rămîn blocate. Situaţia este inversă în cazurile de metaplazie mieloidă cînd hematopoieza se desfăşoară şi în interiorul sinusurilor venoase medulare,

Scanned with OKEN Scanner

splenice etc., astfel încît diabaza nu poate fi controlată, ceea ce explică mielemia ce caracterizează unele tipuri de metaplazie.

În fig. 2-14 sînt redate sintetic etapele evolutive ale eritrocitului, din stadiul de celulă suşă, pînă în stadiul de eritrocit uzat, în iminenţă de hemoliză.

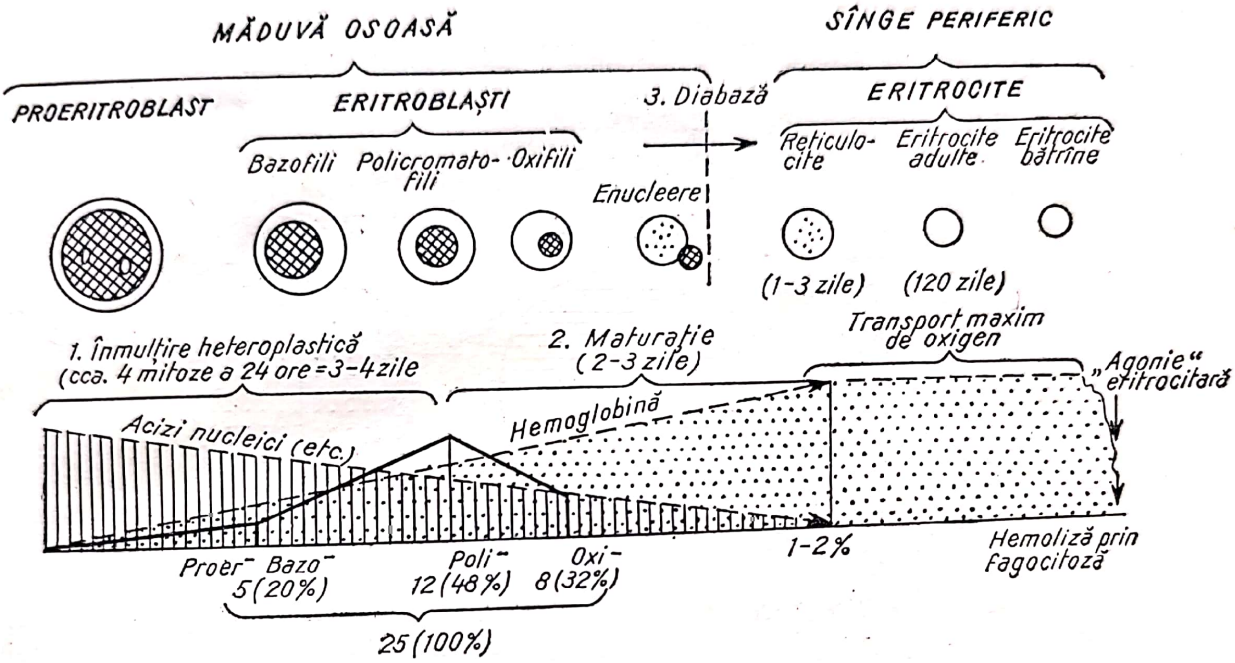


Fig. 2-14. Reprezentare schematică a etapelor evolutive ale elementelor seriei roşii (întregul eritron).

Prima parte a ciclului se petrece în măduva osoasă unde se parcurg 3 etape: 1) eritroblaşti tineri capabili de diviziune; 2) eritroblaşti evoluaţi, incapabili de diviziune şi 3) eritroblaşti ajunşi în pragul maturităţii (expulzia nucleului şi diabaza). Partea a doua a ciclului (dreapta) reprezintă eritrocitele tinere (reticulocitele), cele adulte, precum şi cele bătrîne („agonice") din sîngele periferic.

3. REACŢII PATOLOGICE ALE MĂDUVEI HEMATOGENE

În măduva osoasă se produc mai multe tipuri de stări reactive, cunoscute sub denumirea de *reacţii elementare*, care rezultă, fie din alterarea parenchimului, fie din alterarea reticulului, dar mai ales din combinarea acestora. Mielograma ne oferă relativ puţine informaţii în legătură cu aceste reacţii; ele se evidenţiază mai exact prin observaţii histologice. Reacţiile elementare medulare sînt: hiperplazia hipo- şi aplazia, metaplazia, anaplazia, scleroza, metastazele* (fig. 2-15) precum şi alte reacţii ca edemul, hipervascularizaţia, necroza (117, 137, 155, 219, 263, 271, 332).

Între aceste reacţii există, de regulă, o intricare strînsă; în aceeaşi zonă pot exista mai multe tipuri de reacţie. Pentru astfel de combinaţii

* De la cuv. gr. *hyper*=mai mult; *hypo*=mai puţin; *ana*=iarăşi, deasupra, de-a curmezişul; *meta*=după; *plassein*=a forma; *skleros*=tare, dur.

se utilizează denumirea generală de displazie, de exemplu, o hiperplazie se poate însoţi de metaplazie, anaplazie, scleroză, sau de alte forme reactive. Tot ca displazie se consideră şi situaţiile în care măduva, deşi hiperplazică nu are capacitate de maturare, ca în cazurile de anemie feriprivă, anemie sideroblastică, crizele aplazice din cursul anemiilor hemolitice etc.

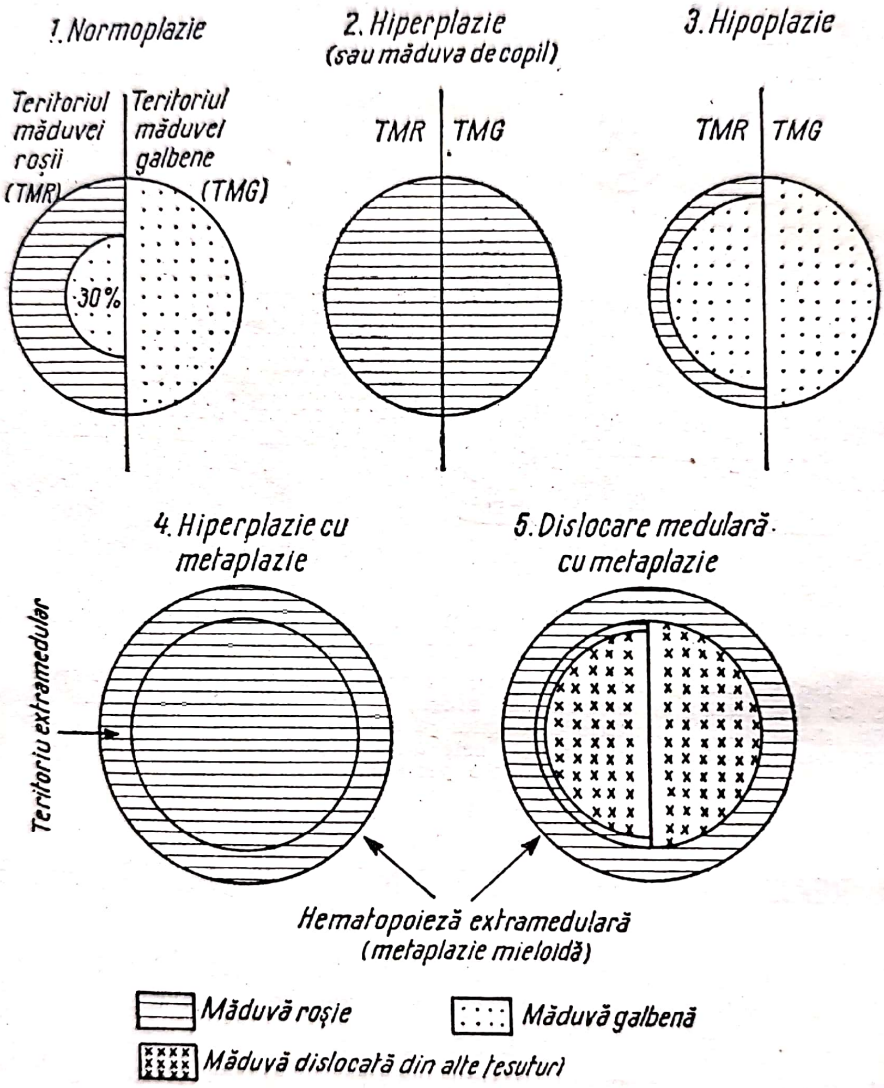


Fig. 2-15. Reprezentare figurativă a stărilor de normoplazie, hiperplazie, hipoplazie şi metaplazie medulară la adult.

În normoplazie aproximativ 1/2 din măduva osoasă este roşie, iar 1/2 galbenă; măduva roşie normală conţine ea însăşi 25—35% adipocite. În hiperplazie dispar întîi vacuolele grăsoase din măduva roşie, după care hematopoieza se extinde şi la măduva galbenă (măduva de rezervă). La copil întreaga măduvă este roşie. Cînd măduva osoasă hiperactivă, de la adult sau copil, nu satisface nevoile crescute ale periferiei, intră în acţiune şi organele cu potenţial hematopoietic (splina, ficatul etc.); acelaşi proces are loc şi în cazurile în care măduva este „dislocată" din spaţiile medulare, prin proliferarea altor celule.

a. **Hiperplazia medulară.** Sub termenul de hiperplazie medulară se înţelege înmulţirea elementelor celulare care fac parte din „parenchimul" medular (fig. 2-16).

După criteriul considerat, hiperplazia medulară poate fi de diferite tipuri:

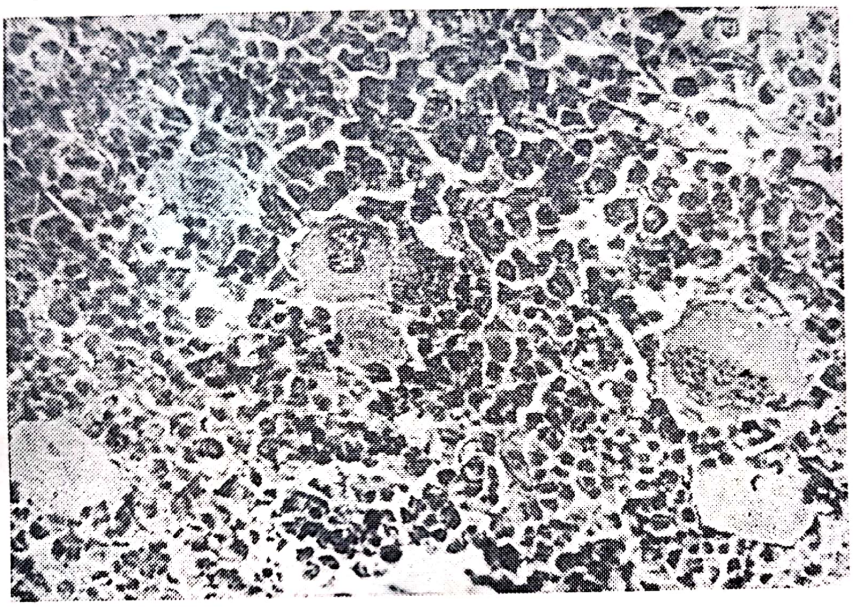


Fig. 2-16. Hipercelularitate medulară cu predominanţa elementelor din seria roşie.

Numeroase megacariocite; dispariţia totală a vacuolelor grăsoase. Bolnavul S. L. (51 ani) dg. policitemia vera. Biopsie osoasă, coloraţie hematoxilină-eozină (H—E); obs. Al. Vilcu şi Lucia Câmpeanu, 1971.

1) *După caracterul pasager sau permanent al hiperplaziei:*

a) *Hiperplazia reactivă sau compensatoare,* ca cea din anemiile posthemoragice acute, anemiile hemolitice sau poliglobuliile secundare; acest tip de hiperplazie este urmarea unor stimuli umorali exercitaţi asupra măduvei.

b) *Hiperplazia autonomă,* este independentă de factorii umorali; în aceste cazuri măduva produce elemente sanguine peste necesităţi, producţia acestora căpătînd un caracter invadant, de exemplu, boala Vaquez, leucemii etc.

2) *După seriile hematopoietice interesate:*

a) *Hiperplazia globală,* în care toate seriile sanguine se află în stare de proliferare activă; în boala Vaquez, în afara hiperplaziei predominante a seriei roşii, se produce şi hiperplazia de însoţire a celorlalte serii medulare; în mod fiziologic, în măduva fetală şi a copilului mic, toate seriile sanguine sînt într-o stare de proliferare activă;

b) *Hiperplazia selectivă* interesează una sau cel mult două serii de celule sanguine. În anemii hemolitice se produce o hiperplazie a seriei roşii; de asemenea, în poliglobulia secundară (de altitudine, din afecţiuni

Scanned with OKEN Scanner

cardio-pulmonare și altele), se realizează hiperplazii compensatorii ale acestei serii. Tot astfel există numeroase situații în care se întîlnesc hiperplazii ale seriei granulocitare și trombocitare. În general, hiperplaziile selective secundare (reactive) nu duc la stînjenirea celorlalte serii mieloide, cum este cazul în hiperplaziile autonome.

3) *După eficiența hiperplaziei* la nivelul seriei roșii există:

a) *Măduva bogată cu funcționalitate eficientă:* în aceste cazuri, în cadrul hiperplaziei se găsește o predominanță mai accentuată decît în mod normal a elementelor cu un grad avansat de maturare (eritroblești policromatofili tip II și mai ales eritroblești oxifili) de exemplu anemiile hemolitice de gravitate medie bine compensate.

În legătură cu extinderea activității hematopoietice în teritoriile măduvei galbene, Cazal a găsit, într-un caz de anemie hemolitică, o creștere cantitativă a măduvei roșii de la 1 365 cm³ (înainte de instalarea procesului hemolitic), la 2 500 cm³ (în cursul hemolizei); numărul eritroblaștilor a crescut de la 77,6/cm³ la 1 210/cm³.

b) *Măduva bogată dar ineficientă.* În aceste stări măduva, deși bogată (angajată în producerea de eritrocite), răspunde numai parțial la stimulările primite; ea nu este capabilă să furnizeze produsul finit, elementele figurate. Din lipsa procesului de maturare, la mielogramă măduva apare adesea deviată la stînga („măduvă albastră"); precursorii eritrocitari devin adevărate „rebuturi de fabricație" fiind fagocitați de macrofage *in situ* (91, 139). În aceste cazuri se pune în evidență creșterea excreției de urobilinogen și a turnover-ului fierului plasmatic.

Eritropoieza ineficientă este întîlnită în cazurile de anemie cu sideroblești (anemie sideroacrestică), în anemiile megaloblastice, talasemie, eritro-leucemie, anemiile feriprive. Chiar și în condiții normale 10—15% din activitatea eritropoietică nu ajunge să producă elemente finite; măduva menține în teritoriile eritropoietice o anumită „rezervă" de eritroblești, pe care nu-i maturează, ci îi păstrează un timp pentru cazul unor eventuale solicitări ale periferiei. Acești eritroblești, aflați „la jumătatea drumului: între celulele stem și cele finite, ar fi mai prompt disponibili decît cei formați prin stimularea „pool"-ului de rezervă (2—4 zile față de 6—8 zile).

b. **Hipoplazia și aplazia medulară.** În cazurile în care există o reducere a capacității de regenerare medulară apare starea de hipoplazie sau de aplazie (fig. 2-17); aplazia este în fond o hipoplazie foarte avansată a elementelor medulare active. După modul în care sînt interesate seriile sanguine există:

1) *Hipoplazie sau aplazie globală,* cînd procesul interesează simultan toate seriile mieloide; rezultatul este o panmielopenie sau chiar o panmieloftizie; uneori aplazia interesează chiar și seria limfatică, serie care este de obicei ultima care „cedează terenul"; de regulă această serie este prezentă reacționînd la dispariția seriilor mieloide.

2) *Hipoplazia sau aplazia parțială sau selectivă,* monocitopenică sau dicitopenică (cînd procesul aplastic interesează o singură serie sau două serii.

Scanned with OKEN Scanner

Histologic, aplazia se traduce prin dispariția celulelor mieloide în profitul adipocitelor; acestea vin în contact între ele, celulele hematoformatoare ocupînd doar unele spații mici „intervacuolare", iar în teritoriile unde și aceste „oaze" sînt dispărute, măduva are un aspect de „măduvă de șoc" (*„moelle de sureau"*). Celulele conjunctive pot fi și ele hi-

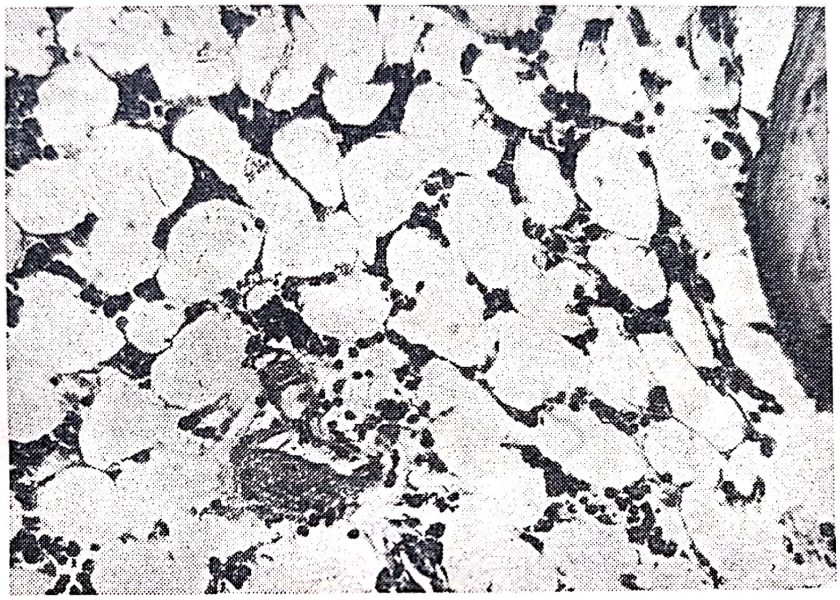


Fig. 2-17. Aplazie (hipoplazie forte) a măduvei osoase.
Vacuolele grăsoase predomină net în cîmpurile microscopice, cariocitele sînt în număr redus, dispuse printre lipocite, în majoritate celule limforeticulare. Bolnavul M. I. (41 ani), dg. insuficiență medulară globală. (Biopsie osoasă, colorație H—E; obs. Al. Vîlcu și Lucia Câmpeanu, 1972).

perplaziate, împreună cu fibrele conjunctive și cele de reticulină. Alteori chiar și țesutul conjunctiv este pe cale de dispariție, situație care accentuează și mai mult gravitatea prognosticului.

c. **Metaplazia mieloidă** reprezintă schimbarea structurii unui organ prin înlocuirea unui țesut cu altul, apropiat ca structură și funcții, avînd, de cele mai multe ori, aceeași origine ontogenetică. În afara perioadei prenatale, existența unei activități hematopoietice formatoare de elemente mieloide, la distanță de teritoriul medular, sau în sectorul intrasinusal, este un fenomen patologic, cunoscut sub denumirea de metaplazie mieloidă. Un exemplu este metaplazia mieloidă a splinei, care la adult este un organ limfoid; în anumite stări patologice se revine la potențialul ei mieloid din cursul vieții embrionare (143, 219). Metaplazia mieloidă poate apărea în circumstanțe variate și anume:

1) *Metaplazii reacționale* întîlnite mai ales la copii în boala hemolitică a nou născutului, anumite anemii hemolitice constituționale sau cîștigate cu evoluție prelungită, reacții de apărare la infecții etc.

2) *Metaplazii în cadrul unor procese maligne* locale ca eritroleucoza, osteomieloscleroza etc.

Scanned with OKEN Scanner

3) *Metaplazii secundare dislocării țesutului hematopoietic* din teritoriile osoase de către procese metabolice ca în osteopetroză.

Măduva osoasă fiind un organ cu celule heterogene, poliferarea locală a celulelor autohtone nu constituie o metaplazie, ci o hiperplazie. În metaplazie, proliferarea celulară nu respectă „compartimentarea" normală, ci ea escaladează peretele sinusal, vasul devenind nu numai hematopurtător, ci și hematoformator.

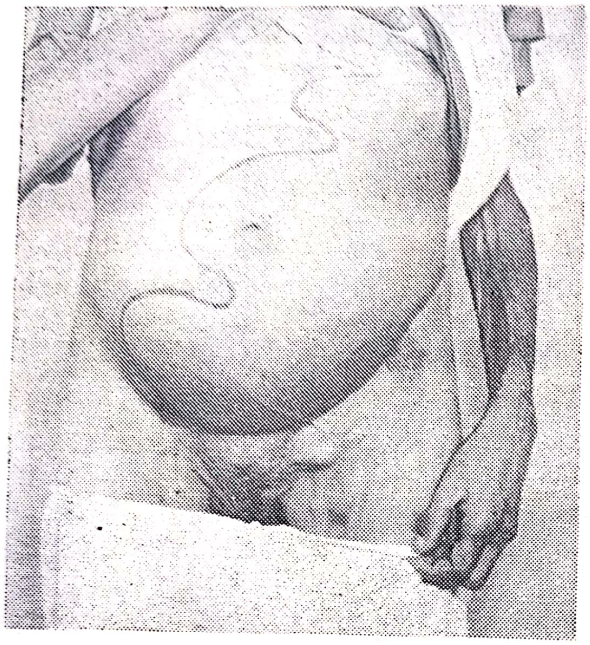


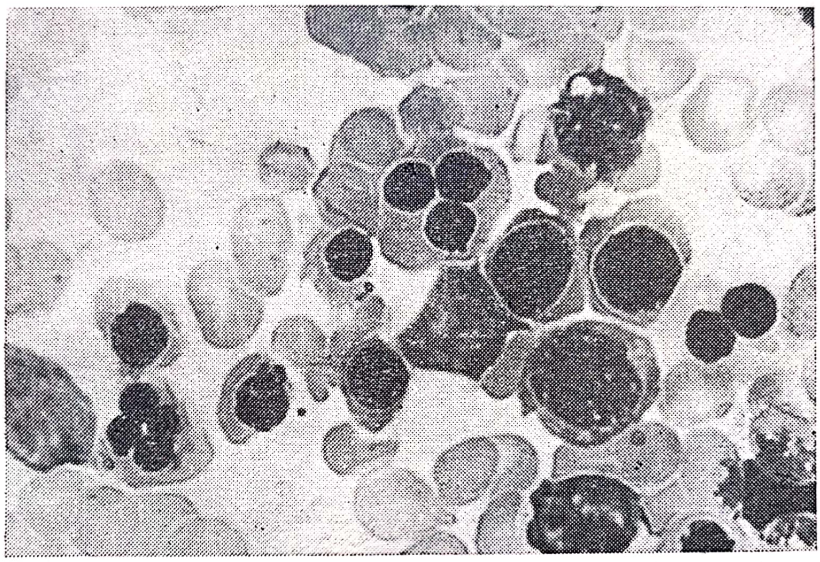
Fig. 2-18. Splenomegalie gigantă prin metaplazie mieloidă splenică.
Bolnava M. M. (69 ani), dg. policitemia vera complicată cu osteo-mielosclerozā splenomegalică (obs. Al. Vîlcu, T. Hossu, Delia Popescu, 1972).

Consecințele clinice ale metaplaziilor extramedulare pot să se traducă prin semne obiective importante ca splenomegalie, uneori considerabilă, hepatomegalie etc. (fig. 2-18). Sub aspect hematologic, hematopoieza extramedulară din splină, ficat etc. nu este niciodată de calitatea celei medulare. Organele cu metaplazie mieloidă livrează sîngelui periferic elemente cu dismorfism, manifestat prin anizocitoză, poikilocitoză etc., iar controlul diabazei în aceste organe nu este nici el atît de eficient ca în organele hematopoietice, permițînd pătrunderea în circulație de elemente imature ca eritroblești, metamielocite, mielocite și chiar megacariocite. Prezența celulelor tinere în sîngele periferic, de proveniență extramedulară (inclusiv intrasinusală), dovedește că diabaza „improvizată" în organele care au reluat în mod patologic funcții hematopoietice abandonate înainte de naștere, nu este suficient de selectivă.

d. **Anaplazia medulară** reprezintă o schimbare a morfologiei celulare din cauza pierderii capacității de diferențiere normală în sensul specific celulei respective. Această tulburare în evoluția celulară are un substrat biochimic, alterările morfologice fiind consecințe secundare ale tulburărilor metabolice celulare. Spre deosebire de hiperplazia pură, în care apar modificări celulare cantitative, în anaplazie modificările sînt de ordin calitativ (4, 5, 143). Anaplazia poate fi întîlnită, atît la celule netumorale (de exemplu, la megaloblaștii din anemia Biermer, anemia diseritropoietică congenitală), cît și la celule tumorale (megaloblaștii tumorali din eritremia acută) (fig. 2-19). Asocierea mai multor semne poate însă furniza date importante pentru diagnosticul de malignitate; din partea nucleului acestea sînt: anizonucleoza, polimorfismul nuclear, modificarea raportului nucleocitoplasmatic în favoarea nucleului, hipercromazia, creșterea numărului și dimensiunilor nucleolilor, mitozele anormale etc.; din partea

citoplasmei apar anizocitoza şi polimorfismul celular în totalitate, colorabilitatea anormală, vacuolizările şi altele (168).

e. **Mieloscleroza** este o leziune relativ frecvent întîlnită a măduvei osoase, în condiţii etiologice variate. Ea poate fi pură sau asociată cu osteoscleroza, ambele avînd la bază o reacţie fibroasă a compartimentului



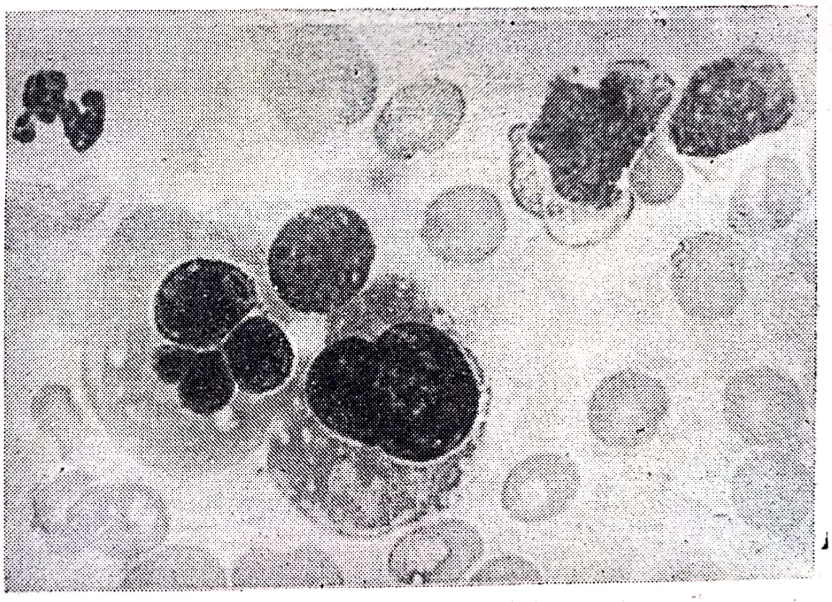


Fig. 2-19. Exemple de anaplazie mieloidă în eritroblaştii din măduva osoasă (obs. Constanţa Ursea şi Adriana Coliţă).
Sus: eritroblaşti cu 2—3 şi 4 nuclei în anemia hemolitică diseritropoietică tip II (bolnava C. E. — 29 ani); *jos:* doi megaloblaşti monstruoşi în boala Di Guglielmo (eritroleucemie) (bolnavul D. Z. — 55 de ani).

osteo-medular. Osteoscleroza pură reprezintă, în general, o densificare a scheletului, mai ales la nivelul spongioasei, unde are loc hematopoieza. Această densificare poate fi de tip calcar, ca în osteopetroză (vezi

Scanned with OKEN Scanner

fig. 2-33) sau de tip osteoid, cînd osteoneogeneza este în stare de tramă proteică ca în osteomieloscleroza de tip Heuck.

Alături de aceste două aspecte cu totul diferite de hiperplazie a țesutului osos, poate exista un proces de mielosclerozǎ în care leziunea histologică inițială și principală este la nivelul țesutului conjunctiv, adevărată „cicatrice medulară"; aici, în afara hiperplaziei de celule conjunctive, se constată o densificare a rețelei de reticulină și de colagen

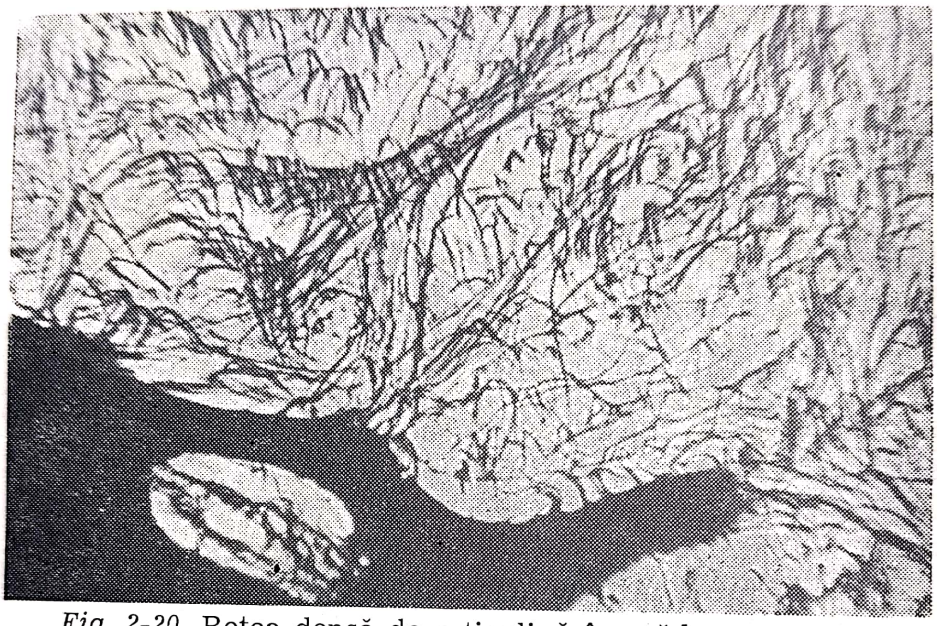


Fig. 2-20. Rețea densă de reticulină în măduva osoasă.
Bolnava P. E. 56 de ani, dg. anemie severă prin „dislocare mecanică" a parenchimului medular, biopsie osoasă, impregnație argentică (obs T. Hossu, A. Vîlcu 1972).

Fig. 2-21. Metastază epiteliomatoasă într-un sinus medular acompaniată de scleroză accentuată.
Bolnavul C. M. de 45 ani, dg. epiteliom rinofaringian; biopsie osoasă, colorație hematoxilină-eozină (obs. Al. Vîlcu, Câmpeanu Lucia, 1973).

Scanned with OKEN Scanner

(fig. 2-20). Pe lîngă aspectul histologic local, procesul de mielosclerozā se traduce prin modificări histologice la distanță și prin numeroase alte semne clinice și biologice (108, 109, 332).

f. **Metastazele medulare** reprezintă însămînțarea cu celule neoplazice la distanță de locul în care a apărut inițial procesul proliferativ malign. În măduva osoasă se produc frecvent metastaze cu celule maligne provenite din plămîn, sîn, prostată, rinichi, tiroidă etc. (139, 225).

Grefarea organelor și țesuturilor cu celule maligne poate avea loc pe cale sanguină, limfatică sau prin permeabilizarea realizată de depolimerizarea substanței fundamentale (a mucopolizaharidelor) de către unele celule canceroase care posedă această proprietate. Microscopic, metastazele seamănă cu tumora primitivă, încît țesutul de origine se poate recunoaște uneori la biopsia organului metastazat. Metastazele medulare pot fi puse în evidență prin puncții osoase dar mai ales prin biopsii; ele pot fi recunoscute prin placardele de celule tumorale, mai mult sau mai puțin întinse (fig. 2-21).

g. **Alte reacții elementare medulare.** Dintre reacțiile medulare mai puțin frecvente, care pot însoți numeroase procese patologice (332) trebuie amintite:

— *edemul gelatiniform* care se manifestă prin zone amorfe, localizate între traveele osoase, infiltrînd spațiile dintre vacuolele grăsoase ocupate în mod normal de celulele hematopoietice; această leziune descrisă de Dominici se întîlnește frecvent în cazurile de aplazie medulară;

— *hemoragiile* constituie și ele leziuni intertrabeculare; sîngele din sinusuri difuzează în parenchimul propriu-zis, de unde nu poate fi trecut în curentul circulator; consecutiv, eritrocitele se lizează formînd zone amorfe negricioase;

— *necroza* este un proces caracterizat prin devitalizarea unor grupuri de celule, consecutiv unui număr mare de factori (fizici, chimici, metabolici etc.). Necrozele medulare apar cel mai frecvent ca urmare a unor tulburări de circulație locală, secundare conflictului antigen-anticorp, sau prin blocarea sistemelor enzimatice celulare. Microscopic, se constată, la nivelul nucleului, picnoza, iar la nivelul citoplasmei, pierderea conturului celular; celulele formează între ele o masă amorfă, iar organitele citoplasmatice se șterg (intumescență tulbure).

4. REGLAREA ERITROPOIEZEI

Toate populațiile celulare din organism au un ciclu de reînnoire reglat după necesitățile fiziologice momentane. Numărul de eritrocite este menținut și el constant, producția eritrocitară fiind în echilibru cu distrucția (143). Durata de viață eritrocitară fiind relativ fixă, nu este posibilă nici prelungirea, nici scurtarea reglativă a ei; orice mecanism reglator acționează obligator asupra eritropoiezei. Pierderile eritrocitare sînt compensate de adaptarea măduvei osoase la noua situație creată prin creșterea producției de eritrocite; în poliglobuliile artificiale sau în cele secundare, după satisfacerea necesităților, are loc o scădere a producției

Scanned with OKEN Scanner

medulare. Factorul principal care intervine în reglarea eritropoiezei este *eritropoietina.*

a. **Eritropoietina** este un factor umoral circulant în plasma sanguină, avînd rolul de a stimula eritropoieza sub influența concentrației de oxigen în sînge. Ea acționează asupra celulelor stem pe care le dirijează spre seria eritroblastică.

Existența unui factor umoral care stimulează eritropoieza a fost semnalată de Carnot și Delaflandre în 1906, care l-au numit hematopoietină. Ei au constatat că dacă serul iepurilor sîngerați în mai multe reprize este injectat iepurilor normali se produce o creștere a numărului de eritrocite.

1) *Modul de obținere și proprietățile eritropoietinei.* Pînă în prezent au fost făcute multiple tentative de purificare a eritropoietinei din plasmă și din urină, prin precipitare, adsorbție, cromatografie etc.; ea poate fi identificată și prin metode imunochimice; avînd proprietăți antigenice, determină, cînd este injectată unui animal de altă specie, formarea unui ser imun anti-eritropoietină.

Cu toate că nu a fost pînă în prezent izolată în stare complet purificată și cristalizată, se cunosc o serie de date asupra naturii ei chimice. Ea este o glicoproteină din fracțiunea α_2 cu o greutate moleculară de circa 60 000.

Dozarea eritropoietinei în plasmă este astăzi posibilă, dar pînă în prezent nu dispunem de metode chimice directe; se folosesc exclusiv metode biologice, care, pe lîngă faptul că sînt foarte laborioase, au un grad redus de precizie (143). În prezent se utilizează numeroase procedee pentru izolarea și studierea eritropoietinei urinare.

O unitate de lucru pentru eritropoietină este unitatea standard A (ESA); ea reprezintă cantitatea care, administrată unui șobolan înfometat, determină încorporarea a circa 35% dintr-o doză cunoscută de ^{59}Fe. O altă unitate de eritropoietină recomandată recent de către un comitet OMS este eritropoietina standard B (ESB) derivată din urina umană.

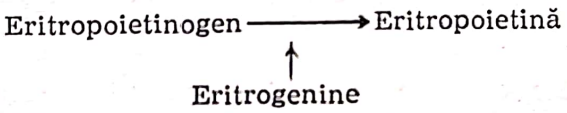
2) *Locul de formare a eritropoietinei.* Pentru stabilirea locului de formare s-au injectat animalelor de experiență filtrate obținute din diferite organe triturate sau s-au extirpat diferite organe ca splina, 90% din ficat, anumite glande endocrine (timus, gonade, tiroidă, pancreas etc.). Numeroase lucrări fac dovada că rinichiul este organul cu rolul cel mai important în sinteza de eritropoietină, fără să se excludă eventuala contribuție și a altor țesuturi (155, 189, 234). O serie de experiențe, bazate pe eliminarea rinichilor (nefrectomie bilaterală, iradiere, lezare toxică etc.), arată că animalele nu mai răspund la stimulii care provoacă în mod obișnuit creșterea eritropoiezei (hipoxie, sîngerare etc.). Sinteza eritropoietinei de către rinichi este dovedită și de autografele renale intraperitoneale care au rolul de a menține producția de eritropoietină, precum și de apariția unor poliglobulii în unele cancere de rinichi sau în hidronefroze. Localizarea intrarenală exactă a producerii de eritropoietină nu se cunoaște cu certitudine. Au fost cercetate, în mod separat, atît corticala cît și medulara; cele mai multe rezultate pledează pentru sinteza la nivelul sistemului juxtaglomerular.

Scanned with OKEN Scanner

Gordon și colab. (1967) aduc argumente după care formarea eritropoietinei serice active (ESF) ar fi o reacție enzimatică între un factor plasmatic, sintetizat de ficat (care este o α_2-globulină) numită „proeritropoietină" (precursor inactiv) și o enzimă renală, numită factor eritropoietic renal (REF), care activează factorul hepatic din plasmă. Eritropoietina activă, astfel formată, ar regla nivelul eritrocitar al organismului. Enzima renală ar fi asemănătoare celei din sistemul renină-angiotensină și kalicreină-bradikinină. După Gordon, toți acești factori ar fi secretați de aceleași celule juxtaglomerulare.

Rinichiul nu este unicul loc de formare a eritropoietinei; numeroase organe par să sintetizeze acest hormon, însă în măsură mult mai redusă decît rinichiul. În acest sens s-a dovedit că nefrectomia bilaterală nu produce o abolire totală a eritropoiezei. O activitate de stimulare a eritropoiezei a fost găsită în conținutul mai multor organe, mai ales în ficat și splină.

În ultimul timp s-a demonstrat că la sinteza eritropoietinei pot participa și alte enzime în afara REF, enzime care au fost denumite *eritrogenine* (342). Pentru proeritropoietină s-a propus, de asemenea, un anume nou, acela de „proeritrogen" (129). Biogeneza eritropoietinei poate fi schematizată, după ultimele cercetări experimentale (11), în felul următor:



3) *Modul de acțiune a eritropoietinei.* Eritropoietina pare să fie factorul umoral principal și, probabil, unic al reglării eritropoiezei. Teoria „unicistă" a eritropoietinei (o singură proteină care reglează întreaga eritropoieză) nu este totuși acceptată de toți autorii (152, 324).

Acțiunea ei se exercită asupra celulelor stem, pe care le transformă în eritroblaști. Prima modificare constantă, după injectarea de eritropoietină purificată, este o stare de excitație medulară, după care se constată o creștere a numărului de proeritroblaști.

Se consideră că eritropoieza la embrion și făt este independentă de reglare eritropoietinică de la copil și adult, controlul eritropoiezei în această perioadă făcîndu-se după un sistem cu totul de altă natură.

b. **Mecanismele de reglare a eritropoiezei** sînt specifice și nespecifice (234, 298).

4) *Stimularea eritropoiezei prin factori specifici* este influențată de două mecanisme, unul umoral și altul nervos.

a) *Reglarea umorală a eritropoietinei (rolul hipoxiei).* Oferta scăzută sau crescută de oxigen către țesuturi stă în centrul reglării specifice a eritropoiezei. Hipoxia este cel mai puternic stimul fiziologic al eritropoiezei, indiferent dacă provine din presiunea parțială scăzută a O_2 în aerul atmosferic, din tulburările schimburilor gazoase în plămîn, din amestecul sîngelui arterial cu sîngele venos sau din alterarea capacității de transport a sîngelui (anemie sau methemoglobinemie) (fig. 2-22). Cînd

apare o concentrație critică, supraliminară de hemoglobină, se instalează un proces de *feed-back* negativ care întrerupe circuitul sintezei de acizi nucleici.

b) *Reglarea nervoasă a sintezei de eritropoietină.* Măduva osoasă este bine înzestrată cu fibre amielinice. Influențele central nervoase au un rol important în mișcările leucocitelor în sîngele periferic, dar și tabloul eritrocitar poate fi modificat prin influențe din partea sistemului nervos central.

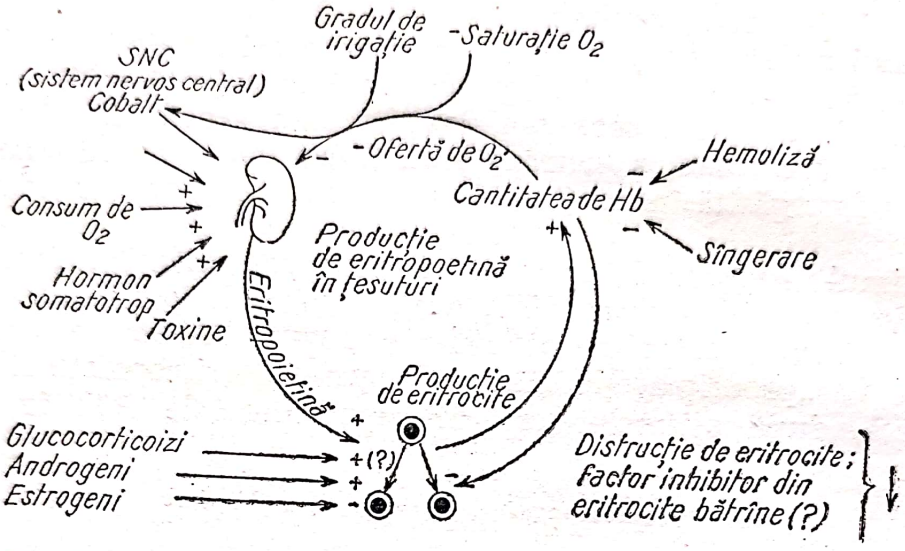


Fig. 2-22. Reprezentare schematică a modului prezumptiv de reglare a eritropoiezei prin intermediul eritropoietinei (după M. Heimpel, 1968).

Baciu și colab. (11, 12, 13, 94) (catedra de fiziologie din Cluj) explică reglarea eritropoiezei după următoarea concepție neuroumorală:

„Hipoxia, stimulul specific al eritropoiezei, acționează atît asupra zonei chemoreceptive sino-carotidiene, cît și direct asupra centrilor nervoși vegetativi superiori. Stimularea chemoreceptivă sino-carotidiană declanșează o serie de reacții reflexe, adaptative imediate: circulatorii, respiratorii și de repartizare a sîngelui. După o perioadă de latență de 3—5 zile, necesară pentru maturarea proeritroblaștilor, generați sub influența eritropoietinei, apare reticulocitoza și poliglobulia periferică. Celor două mecanisme de reglare: neuroreflex (avînd ca rezultat mobilizarea reticulocitelor și eritrocitelor din organele formatoare și de depozit) și neuroumoral (cu secreția de eritropoietină), le corespund structuri diferite ale sistemului nervos central".

Secționarea măduvei spinării sub nivelul C_4 face ineficiente ambele mecanisme de reglare a căror cale efectoare este medulo-simpatică. Prin mecanismul exclusiv periferic se menține, în continuare, un echilibru al procesului eritropoietic și chiar un rudiment de reglare.

2) *Stimularea eritropoiezei prin factori nespecifici*

a) *Acțiunea cobaltului asupra eritropoiezei* o amintim aici, deși nu are nici un rol în reglarea fiziologică a eritropoiezei. Cobaltul este singura substanță străină de organism, cunoscută pînă în prezent, care produce o stimulare a eritropoiezei, ducînd la creșteri ale numărului de eritrocite și a nivelului de hemoglobină (143, 234). Acțiunea cobaltului asupra eritropoiezei (foarte bine reproductibilă pe animalele de experiență) nu

se bazează pe influența directă asupra eritroblaștilor, ci pe stimularea formării eritropoietinei, posibil prin inhibarea enzimelor celulare transportoare de O_2 și prin crearea, deci, a unei hipoxii tisulare.

b) *Reglarea umorală nespecifică a eritropoiezei.* Glandele endocrine au o acțiune reglatoare asupra eritropoiezei; dovada în acest sens o constituie anemia care apare experimental după extirparea hipofizei, suprarenalelor, tiroidei sau a glandelor sexuale, precum și în cazurile de insuficiență a acestor glande. Stimularea neuro-endocrină a eritropoiezei este departe de a fi clarificată; se pare că rolul atribuit acestui complex în urmă cu două-trei decenii, în reglarea tuturor proceselor din organism, a fost pe alocuri exagerat. Este dovedit că sistemul nervos și endocrin comandă diverse sinteze biologice, dar nu acționează direct asupra aparatului genetic (234).

Excluderea hipofizei (a lobului anterior), atît la om (sindromul Sheehan sau cașexia Simmonds), cît și la animalele de experiență, este urmată de o anemie evidentă, prin diminuarea producției de eritrocite.

Glucocorticoizii din suprarenală au un efect stimulator asupra eritropoiezei (poliglobulia din boala Cushing).

Hormonii tiroidieni acționează stimulativ asupra eritropoiezei. În hipotiroidie se constată o hipoplazie a măduvei roșii cu anemie, iar în hipertiroidie — o creștere a seriei roșii.

Androgenii acționează stimulator, iar estrogenii, inhibitor asupra eritropoiezei. Regenerarea eritrocitară la donatorii de sînge bărbați, este mai puternică decît la femei. Administrarea îndelungată a androgenilor în doză mare (exemplu 50 mg metiltestosteron pe zi la om) poate duce la poliglobulie. Androgenii acționează, nu substitutiv, ci printr-o stimulare veritabilă, deși nespecifică, direct asupra măduvei; același lucru este valabil și pentru acțiunea inhibitoare a estrogenilor.

c. **Eritropoietina în bolile de sînge.** Teoretic, în patologie ar trebui să se constate hiposecreție de eritropoietină în anemii și hipersecreție în caz de poliglobulii. La mulți bolnavi cu anemie titrul eritropoietinei este crescut, uneori chiar foarte mult, fără să existe, în general, o proporționalitate cu gradul anemiei. Se poate spune că un titru semnificativ crescut apare numai la bolnavii cu anemie severă (sub 8 g Hb%), dar nu absolut obligator. O corelație cantitativă cu gradul anemiei apare numai dacă se compară anemii cu aceeași patogenie, dar de grade diferite de severitate. Activitatea eritropoietinică a plasmei scade repede după transfuzarea cu sînge a bolnavilor anemici. Datele asupra cantității de eritropoietină în diferitele boli de sînge nu sînt unitare, probabil și din cauza unor metode imperfecte de dozare (98, 143, 234).

Valorile cele mai mari de eritropoietină apar în anemiile aplastice, chiar dacă activitatea eritropoietică se dovedește a fi mult diminuată. Cu toată creșterea semnalată, anemia persistă, probabil din cauza neconsumării eritropoietinei la nivelul măduvei. Același mecanism acționează, probabil și în cazurile de eritroblastopenie congenitală, idiopatică sau secundară unui timom. Valori crescute de eritropoietină se constată de obicei în anemiile hemolitice intra- și extraeritrocitare, precum și în

Scanned with OKEN Scanner

anemiile posthemoragice severe; scăderea ei în unele forme s-ar datora unui consum exagerat de eritropoietină.

Titruri scăzute se găsesc adesea în anemiile feriprive prin microhemoragii și în alte anemii secundare, ca anemia de sarcină. Tot în aceste afecțiuni se constată creșteri ale eritropoietinei în cursul tratamentului cu fier. Anemiile apărute în cazurile de insuficiență renală au fost amplu studiate din cauza interesului teoretic ce îl prezintă. Autorii au găsit scăderi ale eritropoietinei, care explică lipsa de stimulare medulară (98).

În anemia Biermer rezultatele sînt discordante.

În policitemia vera s-a găsit, nu rareori, un nivel crescut de eritropoietină, ceea ce nu se potrivește prea bine cu încadrarea unanim acceptată a acestei boli în sindromul mieloproliferativ unde proliferarea nu este consecința unei stimulări. În poliglobulia secundară a cardiopulmonarilor, precum și în rarele cazuri de poliglobulie renală, eritropoietina este cu regularitate crescută, după cum, de altfel, este și de așteptat.

Încercările terapeutice cu eritropoietină nu au dat pînă în prezent rezultate satisfăcătoare.

II. MIJLOACE DE EXPLORARE A ERITROPOIEZEI

Componentele circulante și fixe ale țesutului sanguin pot fi investigate prin numeroase procedee biologice. În prezent, în laboratoarele moderne abundă tehnici din ce în ce mai precise și mai rapide; laboratorul clinic de hematologie a devenit astăzi o specialitate medicală cu rol adesea hotărîtor, nu numai în bolile hematopoietice, ci în toate patologia medicală (14, 46, 157, 274).

O problemă care preocupă medicina modernă, iar hematologia în mod special, este *standardizarea*. Este cunoscut că discordanțele dintre rezultatele unor determinări biologice se datoresc, în mare parte, diversității tehnicilor și aparatelor utilizate. În vederea găsirii unui „limbaj comun" s-au creat diferite organisme internaționale cum este „Comitetul Internațional de Standardizare în Hematologie" (I.C.S.H.) instituit la Stockholm (1964), din care fac parte cei mai de prestigiu experți în domeniul respectiv din lume, printre care și din țara noastră (157, 250, 274).

a. **Eritrokinetica.** Menținerea masei eritrocitare în limitele normale este o rezultantă a echilibrului dintre formarea și distrugerea de eritrocite.

Eritrokinetica poate fi definită ca un *proces global* rezultat din producția, circulația și distrucția eritrocitară *(eritropoieza eficientă)* din care se scade *eritropoieza ineficientă* (celulele eritrocitare care, dintr-o cauză oarecare, nu ajung să apară în periferie).

Metode de evaluare a eritrokineticii globale. Cantitativ, bilanțul „intrări-ieșiri" al eritropoiezei poate fi apreciat pe baza următoarelor date:

a) *Numărul de celule în sîngele periferic și în măduvă.* Numărătoa-

rea de eritrocite și hematocritul în sîngele periferic pe de o parte, coroborate cu densitatea celulelor medulare (evaluată prin puncție și biopsie medulară) și cu raportul granulocite-eritroblaști, este primul criteriu de apreciere a efortului medular.

b) *Curba de maturare a eritroblaștilor* este criteriul de evaluare a eficienței producției medulare; în măduva normală, peste 75% din eritroblaști sînt într-un stadiu avansat de evoluție (vezi și pag. 123).

c) *Numărul de reticulocite din sîngele periferic* este, de asemenea, un indiciu prețios al eficienței eritropoietice; această cifră nu trebuie interpretată numai procentual, ci și în valoare absolută (vezi și pag. 206).

d) *Durata de viață a eritrocitelor*, demonstrează, de asemenea, activitatea eritropoietică efectivă (vezi pag. 433).

e) *Turnover-ul fierului plasmatic* este și el un indiciu prețios pentru aprecierea activității eritropoietice totale; cînd acesta este crescut, interpretarea sa este practic indubitabilă, pe cînd descreșterea turnoverului nu reflectă totdeauna cu acuratețe eritropoieza (vezi pag. 358).

f) *Excreția urobilinogenului fecal* oferă o apreciere prețioasă a cantității totale de piroli catabolizați. Ea nu evidențiază numai pigmenții descompuși în sîngele circulant, ci și pigmenții rezultați din fagocitarea intramedulară a eritroblaștilor, expresie a activității eritropoietice totale.

b. **Clasificarea fiziopatologică a anemiilor**

A) *Anemii cu măduvă bogată (anemii proliferative)*

1) *Anemii cu răspuns eficient la stimuli* (număr crescut de eritrocite vărsate în sîngele periferic; înmulțire, maturare, diabază prezente).

a) Anemii prin creșterea pierderilor eritrocitare: hemoragii acute.

b) Anemii prin creșterea distrugerilor eritrocitare:

— anemii cu sinteză crescută de eritrocite normale: anemii hemolitice extraeritrocitare;

— anemii cu sinteză crescută de eritrocite patologice: anemii hemolitice intraeritrocitare.

2) *Anemii cu răspuns ineficient la stimuli* (hiperplazie eritrocitară — înmulțire prezentă — dar cu scăderea numărului de eritrocite oferite sîngelui periferic).

a) Tulburări în „maturarea" nucleară: anemii megaloblastice (deficit de vitamină B_{12}, acid folic, oroticaciduria etc.).

b) Tulburări în maturarea citoplasmei: anemii feriprive, anemii prin tulburarea sintezei porfirinei.

c) Tulburări de maturare mixtă (nucleo-citoplasmatice): anemii refractare.

B. *Anemii cu măduvă săracă* (anemii neproliferative: tulburări de înmulțire celulară).

1) *Anemii prin lipsă de răspuns la stimulii fiziologici* (măduvă depopulată).

a) Anemii prin aplazie medulară.

Scanned with OKEN Scanner

b) Anemii prin înlocuirea măduvei prin alte țesuturi (mielosclerozā, osteopetrozā, metastaze canceroase medulare etc.).

2) *Anemii prin stimulare eritropoietică scăzută.*

a) Anemii prin scăderea celulelor secretoare de eritropoietină (boli renale).

b) Anemii prin anticorpi antieritropoietină.

c) Anemii prin scăderea receptorilor medulari la eritropoietină (boli infecțioase, neoplasme, boli endocrine etc.).

A. MIJLOACE DIRECTE

Explorarea directă a măduvei osoase reprezintă metoda de bază pentru investigarea acestui organ. Examenul citologic al materialului recoltat prin puncție și examinat cu obiectivul cu imersie este un examen calitativ ce se adresează morfologiei celulare; el trebuie adesea completat cu examenul histologic. Deși dispune de o putere de mărire mai redusă, acesta din urmă oferă informații despre arhitectura reală a măduvei și — totodată — date cantitative mai exacte. Compararea datelor citologice cu cele histologice este adesea necesară pentru stabilirea diagnosticului. Hematologia este dominată încă și astăzi de practica investigării exclusiv citologice, neglijîndu-se patologia tramei medulare; puncția biopsie osoasă este încă departe de a cunoaște răspîndirea „explozivă" a puncției osoase, la care îi dă dreptul importanța sa diagnostică.

Explorarea post mortem a măduvei osoase a fost utilizată pe scară largă în jumătatea a doua a secolului trecut cînd anatomia patologică a luat un avînt important. Explorarea extravitală a măduvei cunoaște o mare răspîndire abia după 1928, cînd Arinkin (Leningrad) propune metoda simplă și nemutilantă a puncției sternale (6), care a putut fi aplicată chiar și în cele mai modeste laboratoare. În perioada imediat următoare abundă lucrările în legătură cu citologia hemopatiilor; sute de mii de medici au interpretat milioane de imagini medulare în diferite hemopatii, reușind să stabilească diagnostice precise și să tragă concluzii prețioase în legătură cu hematopoieza normală și patologică.

După al doilea război mondial au apărut numeroase lucrări despre tehnici tot mai perfecționate de trepanație osoasă. În Germania, Berthelheimer (1953), apoi Burchard (61 a) au propus o metodă simplă de biopsie osoasă, ce poate fi practicată chiar în unitățile medicale de asistență ambulatorie (168). În Franța, C. Duhamel (Spitalul St. Antoine, Paris) printr-o metodă nesîngerîndă (100, 102) și mai ales R. Weitz (Strassbourg) printr-un procedeu chirurgical, au efectuat mai multe mii de biopsii osoase iliace și sternale, împărtășind prin numeroase publicații experiențe acumulate timp de mai multe decenii (331, 332). Paralel cu acestea, în țările anglo-saxone s-au aplicat numeroase alte procedee de investigare ale structurilor medulare (158 a).

1. PUNCȚIA MEDULARĂ

Puncția medulară constă din aspirarea cu un ac special a unei mici cantități de sînge medular, care conține o suspensie de celule și mici particule din organ (grunji), care sînt întinse pe lamă și uscate la aer, apoi colorate panoptic ca un frotiu de sînge. În aceste preparate, deși

structura organului se pierde în cea mai mare parte, celulele se pretează deosebit de bine la examinarea citologică; ele pot fi studiate izolat, la o mărire mult mai importantă, ceea ce permite înregistrarea mai multor detalii.

Puncția medulară se poate efectua la nivelul mai multor zone ale scheletului, dar regiunile cele mai des abordate la adult sînt sternul, osul iliac (spinele anterioare și posterioare) și vertebrele (apofizele spinoase ale primelor vertebre lombare) etc. La sugar este de preferat platoul tibial (la 1—2 cm sub tuberozitate). Se va evita puncționarea în apropierea articulației pentru a nu întîlni zona cartilajului de conjugare, care ar putea avea ca urmare o oprire a creșterii tibiei. Alte zone preferate de pediatri sînt apofizele spinoase ale vertebrelor și calcaneul. Puncția sternală clasică este periculoasă la copii; în cazurile în care se execută, se recomandă pătrunderea laterală.

a. **Tehnica puncției sternale.** Puncția sternală este cea mai comodă și mai răspîndită metodă de prelevare de suc medular. Reperele puncției sternale sînt ușor de determinat, stratul grăsos este subțire, iar tăblia osoasă externă este simplu de perforat. De asemenea, sternul conține, la toate vîrstele, măduvă osoasă bogată. Puncția se efectuează de obicei pe linia mediană, la nivelul celui de-al 2-lea sau al 3-lea spațiu intercostal, sub unghiul lui Louis; se va evita pătrunderea cu acul în dreptul coastelor, care sînt zone cartilaginoase, sau în manubriul sternal, care este mai dens și cu conținut mai scăzut în os spongios. Pentru a delimita zona de puncționare, spațiile intercostale din dreapta și stînga sternului vor fi fixate de degetul mare și arătător al mîinii stîngi. Unii preferă anestezia cu 1—2 fiole de xilină 2%. Se pătrunde în țesuturile moi și apoi în os în poziție perpendiculară. Pătrunderea în osul spongios dă o senzație de scădere a rezistenței osoase. Aspirarea sucului medular nu trebuie să depășească 0,5—2 ml. În cursul acestei operații bolnavii acuză o senzație dureroasă asemănătoare unei smulgeri de țesut viu, care este însă un indiciu de reușită a puncției. Durerea este scurtată dacă aspirația se face rapid. Aspirarea abundentă este inutilă; ea nu face decît să dilueze țesutul medular cu sîngele sinusal. Sucul extras se evacuează pe o lamă de sticlă așezată înclinat, pusă într-o cutie Petri. În acest fel sîngele se scurge pe suprafața înclinată, în timp ce grunjii medulari aderă la sticlă. Pentru ca fazele ulterioare aspirației să se desfășoare corect, este bine ca puncția să fie asistată de un ajutor care să treacă imediat la întinderea frotiurilor și la uscarea lor rapidă prin agitare, înainte de formarea rețelei de fibrină care face dificilă sau chiar imposibilă identificarea celulelor. Un frotiu de măduvă bine etalat nu este omogen, ca acela de sînge, ci are un aspect dantelat, cu mici goluri (datorită picăturilor de grăsime). Se va întinde un număr suficient de lame (aproximativ 10); pe 2—3 din acestea, destinate colorării sideroblaștilor, nu se scrie nimic. În afară de frotiurile obișnuite se vor face frotiuri din grunji; aceștia sînt culeși și așezați pe o lamă, apoi se strivesc ușor cu ajutorul altei lame aplicată perpendicular. Frotiurile întinse prin această tehnică sînt puse la colorația panoptică ca și pentru frotiurile de sînge, dar spre deosebire de acestea, fixarea va avea o durată mai lungă, în timp ce

Scanned with OKEN Scanner

colorarea va fi mai scurtă decît pentru sînge. În cazul în care sucul medular este bogat în grunji, o parte din aceștia vor fi adunați cu grijă într-un mănunchi, așezat pe un fragment de lamă de sticlă (de 1 pe 2 cm); rețeaua de fibrină se desface cu stiletul, iar excesul de sînge se aspiră cu o hîrtie de filtru, după care conglomeratul se introduce într-un flacon cu fixator. Acest preparat reprezintă un material pentru biopsie; în continuare în laboratorul de anatomie patologică, se vor face incluzia în parafină, apoi secțiuni histologice obișnuite. În felul acesta, dintr-o puncție osoasă se pot obține, în afara frotiurilor medulare obișnuite, preparate care oferă unele informații asupra structurii măduvei, care se apropie uneori ca valoare de puncția biopsie osoasă.

Înainte de efectuarea puncției sternale, este necesar să se știe dacă s-a efectuat în prealabil radioterapia pe mediastin sau la nivelul zonei supra- sau subclaviculare, care modifică structura histologică locală; în aceste împrejurări nu se pot trage concluzii certe. La persoanele la care s-au efectuat puncționări multiple în aceeași zonă, se poate produce o fibroză locală, ceea ce ar duce la concluzia eronată de hipoplazie medulară.

b. **Accidentele puncției sternale.** Preferința unor hematologi de a alege alte zone de puncție decît sternul este determinată de teama de a nu perfora tăblia internă a osului sub care se găsesc, în imediată apropiere, cordul și venele mari. Acul de puncție neînarmat cu o piedică poate să traverseze și tăblia internă, în cazul în care aceasta este mai subtire sau dacă există un proces de osteoporoză, situație frecventă în hemopatii. Au fost publicate unele cazuri de accidente, în majoritate soldate cu decesul bolnavului.

Într-o serie de 17 cazuri publicate de H. Garnier și colab. se arată că în 15 s-a ajuns la deces rapid, cel mai frecvent în mai puțin de 10 minute; după pierderea inițială a cunoștinței, a urmat colapsul prin hemoragie internă. Examenele anatomice au permis recunoașterea următoarelor leziuni: plăgi penetrante în ventriculul drept (de 5 ori); plăgi miocardice nepenetrante (de 4 ori), plăgi ale feței anterioare a aortei, extra- sau intrapericardice (de 3 ori). Aceste plăgi au fost uneori punctiforme, dar cel mai frecvent au avut un aspect zdrențuit, din cauză că mișcările de basculă anterioară și rotație dreaptă imprimate de fiecare sistolă, provocau dilacerarea zonei perforate. Hemopericardul însoțește frecvent aceste accidente (202).

c. **Mielograma.** Ceea ce caracterizează aspectul general al frotiului de măduvă osoasă este marea variabilitate de celule. Majoritatea carioci-telor măduvei osoase este formată din precursorii seriilor granulocitare și eritrocitare aflate în diferite stadii de maturare (fig. 2-23). Celulele limforeticulare sînt în număr relativ redus, iar cele ale seriei trombocitare apar cu totul sporadic. Limitele de variație ale unei mielograme normale sînt incomparabil mai largi decît ale unui frotiu de sînge (67, 219, 263).

Citirea și interpretarea unei mielograme începe prin examinarea de ansamblu a cîtorva lame mai reușite cu un obiectiv mic, după care se trece la mielograma propriu-zisă. Citirea frotiului nu se va limita la o

Scanned with OKEN Scanner

singură lamă şi cu atît mai puţin la primele cîmpuri întîlnite, ci se va face pe regiuni diferite, alese la întîmplare, din centru, margini şi franjuri; se va evita alegerea preferenţială a unor zone „reprezentative" care, avînd în vedere neomogenitatea distribuţiei celulare, ar putea falsifica rezultatele.

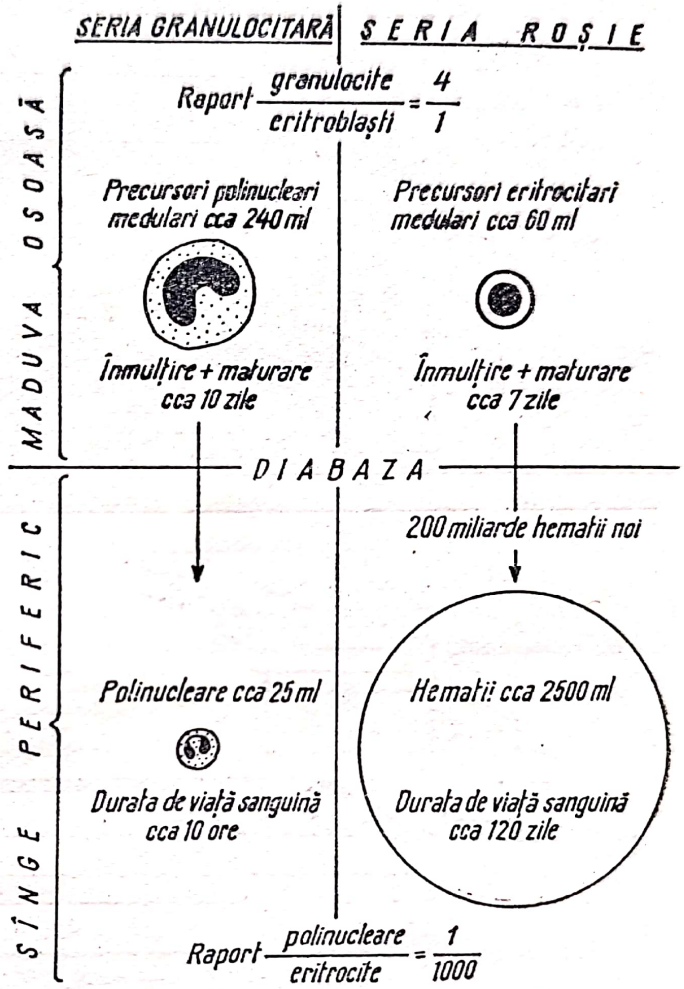


Fig. 2-23. Reprezentare figurativă a raporturilor cantitative dintre seria granulocitară şi seria roşie în măduva hematopoietică în comparaţie cu situaţia din sîngele periferic.

Cu tot volumul mare al măduvei (circa 3 200 mg), din care măduva roşie reprezintă circa 1 600 ml, precursorii elementelor figurate sanguine reprezintă 400—500 ml. Odată cu formarea unui granulocit se formează aproximativ două eritrocite şi 300 de trombocite (292). Acest raport este însă fundamental diferit de acela din sîngele periferic, unde elementele seriei roşii sînt de 700—1 000 de ori mai numeroase decît cele ale seriei granulocitare. Explicaţia este dată, în parte, de durata de viaţă diferită a celor două serii în sîngele periferic.

Obiectivele principale ale unei mielograme sînt: evaluarea numărului de cariocite, a raporturilor dintre serii, stabilirea curbelor de maturaţie, constatarea elementelor patologice şi, facultativ, a coeficientului mitotic.

1) *Celularitatea.* Numărul de elemente nucleate pe mm^3 nu poate fi evaluat cu uşurinţa cu care se determină numărul acestora în sîngele periferic din cauza neomogenităţii ţesutului medular. La aceasta se adaugă efectul aspiraţiei, care rupe pereţii sinusurilor vasculare, diluînd cu sînge elementele figurate şi modificînd raporturile originale ale acestora; de aceea evaluările cantitative în cadrul mielogramei sînt variabile subiectiv, iar uneori, chiar înşelătoare. Numărătorile efectuate în hemocitometru au dat ca valori fiziologice extreme, cifre cuprinse între 30 000 şi 300 000; în aceste condiţii variaţia statistică este mult prea

mare pentru a înregistra, cu caracter semnificativ, variațiile patologice din majoritatea stărilor de boală, motiv pentru care numărătoarea cariocitelor nu este utilizată ca metodă de rutină. Ea se efectuează totuși, ca un indiciu prețios, cu ocazia recoltărilor de suc medular în vederea transplantelor de măduvă.

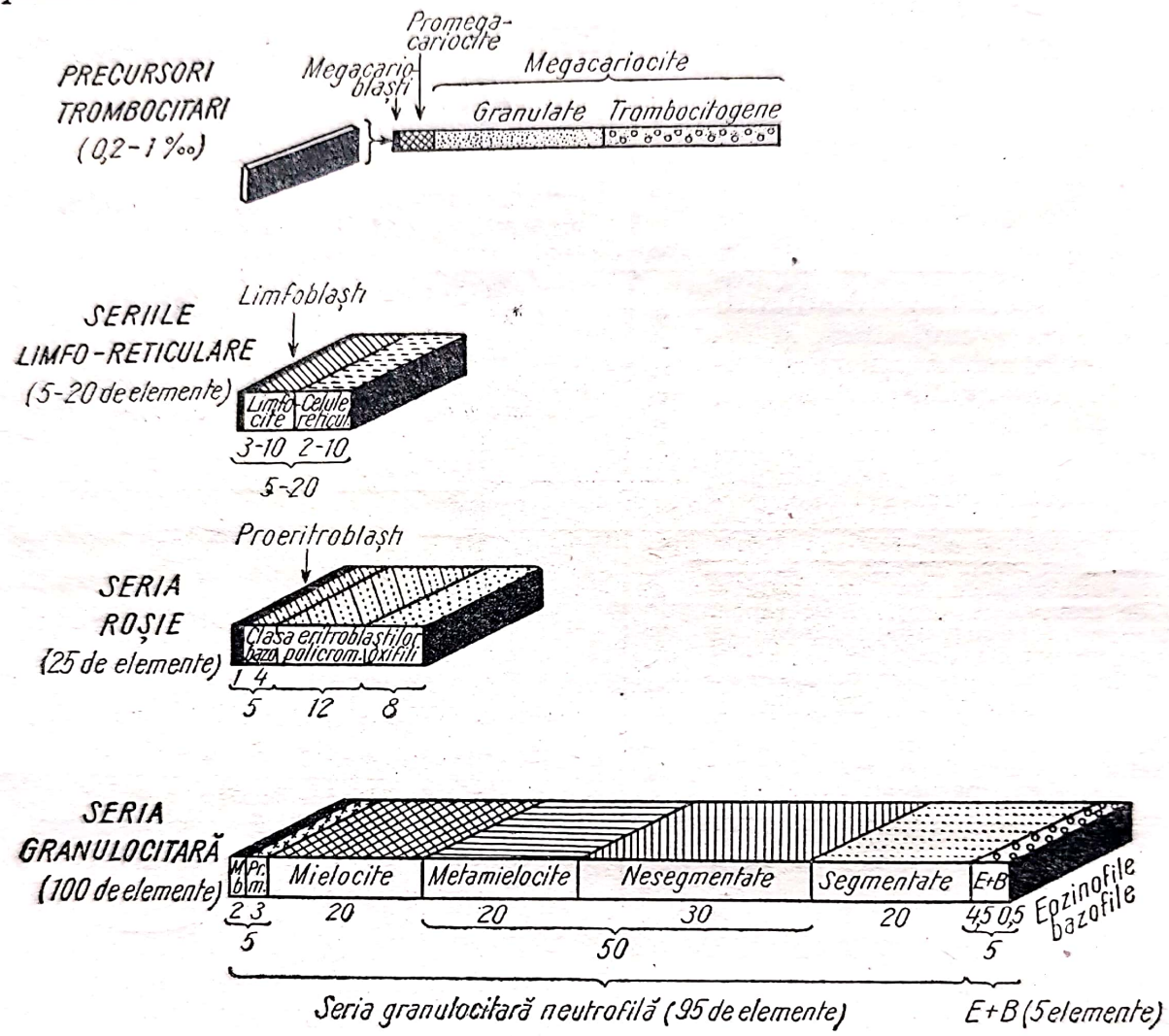


Fig. 2-24. Reprezentare grafică aproximativă a elementelor dintr-o mielogramă normală (pe serii și pe vîrste), raportate la 100 elemente ale seriei granulocitare.

Cu oarecare experiență, la care se adaugă și informațiile obținute cu ocazia efectuării puncției medulare, se poate face totuși o evaluare aproximativă a celularității frotiului medular. Densitatea celulară poate fi apreciată ca foarte bogată, bogată, normală, scăzută, săracă sau nulă („puncție albă"), rezultate ce trebuie interpretate cu discernămînt. Cazurile în care, în urma puncției aspiratoare se extrage suc sanguinolent *(blood tap)*, sau nu se poate extrage nimic *(dry tap)*, sînt numeroase: greșeli de tehnică (vîrful acului nu se găsește în cavitatea medulară), factori patologici (mieloscleroză, infiltrații tumorale, hiperplazie medulară, hipoplazie medulară etc.).

2) *Raporturile dintre seriile celulare.* Recunoașterea celulelor după apartenența lor la una din seriile mieloide, cu stabilirea raporturilor dintre serii, reprezintă al doilea timp al efectuării mielogramei. Depășirea într-o anumită serie celulară (eozinofile, eritroblești, plasmocite, limfomonocite etc.) a limitelor fiziologice de variație este un indiciu prețios pentru diagnostic, care trebuie subliniat în concluziile finale (fig. 2-24).

Majoritatea hematologilor raportează diferitele serii celulare la 100 de celule din seria granulocitară; pentru a fi semnificativă, valoarea procentuală trebuie calculată pe un număr foarte mare de elemente nucleate (de exemplu 500).

Raportul granulocite/eritroblești este de 100 : 25(=4, cu limite între 3 și 5). Uneori raportul este de 100 : 50(=2) sau poate fi chiar inversat: 100 : 300(=0,3), ca în cazurile de anemii hemolitice cu hiperactivitate medulară. Alteori se poate găsi un raport de 100 : 10(=10) sau 100 : 5 (=20) sau și mai mari, ca în cazurile de eritroblastopenie sau de leucemie granulocitară cronică. În eritremiile acute se întîlnește o inversare a raportului, care poate merge pînă la 90 de eritroblești, față de 10 granulocite, cu grad accentuat de anaplazie.

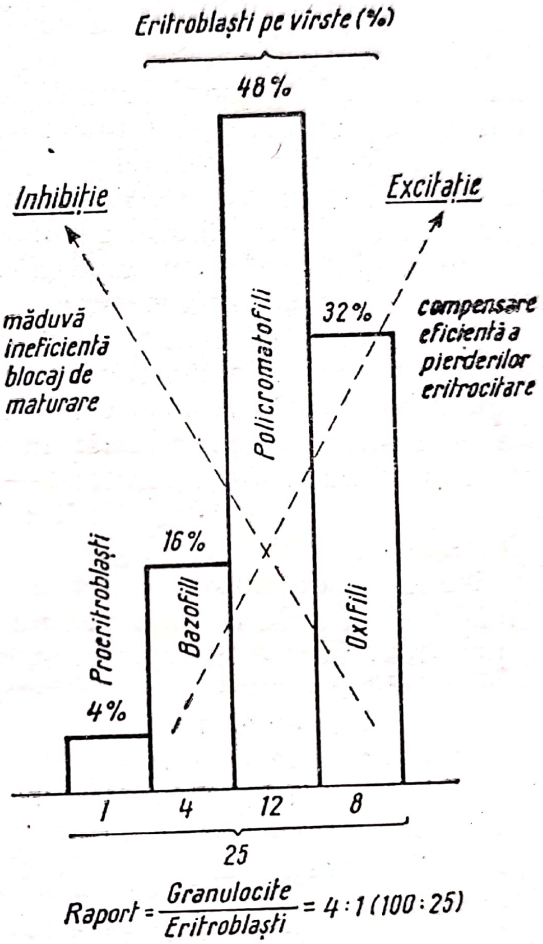


Fig. 2-25. Curba de maturare normală a seriei roșii și cele două tipuri fundamentale de deviere eritroblastică: hiperplazia ineficientă cu blocare în maturație (deviere la stînga) și hiperplazie eficientă (deviere la dreapta).

3) *Curbele de maturare.* Stabilirea vîrstei celulare în cadrul aceleiași serii este al treilea timp al mielogramei. Indiferent de serie, cel puțin 3/4 din cariocite se află într-un grad avansat de maturare sau complet mature. Raportul dintre eritroblaștii policromatofili și cei oxifili este în favoarea celor policromatofili, aceasta și datorită faptului că eritroblaștii policromatofili prezintă o gamă mai largă de nuanțe policromatofile, iar pe de altă parte un număr important al eritroblaștilor oxifili au părăsit deja măduva, pătrunzînd în circulație. În general, predominanța de celule mai mature pledează pentru o măduvă hiperactivă și eficientă, pe cînd o măduvă în care predomină elementele tinere (eritroblești bazofili) denotă o inhibiție medulară cu blocaj de maturație. Proporțiile seriilor granulocitare, trombocitare și limfoplasmocitare, precum și curba lor de maturare reies și ele din fig. 2-25.

Scanned with OKEN Scanner

4) *Prezența pe frotiul medular a celulelor patologice.* În multe cazuri se poate constata pe frotiul de măduvă osoasă prezența unor celule patologice. Unele din acestea își au originea în măduvă, pe cînd altele sînt vehiculate în măduvă din alte organe, ca metastaze.

În numeroase afecțiuni hematologice apar elemente cu morfologie alterată; nu este totdeauna ușoară diferențierea între alterările cu amprenta malignității și acelea care apar în tulburări carențiale. Celulele de tip tumoral pot da metastaze în măduva osoasă într-o proporție de pînă la 25%. În general ele pot fi ușor recunoscute, deoarece se întîlnesc în grupuri mai mari sau mai mici, situate cu predilecție la marginea frotiului. Celulele tumorale pot fi recunoscute de regulă și după conturul difuz și după polimorfismul celular și nuclear. Poliploidia, nucleolii giganți, citoplasma anormal colorată, precum și alte atipii, sugerează caracterul de celule canceroase; de asemenea și numărul crescut de mitoze cu anomalii cromozomiale.

5) *Indicele mitotic* face parte din mielograma clasică; el reprezintă proporția de celule aflate în mitoză, exprimată la 1 000 de elemente din seria respectivă. Datele statistice au arătat că seria limfatică este săracă în mitoze, iar în seria granulocitară incidența mitozelor este aproximativ 5‰ (limite: 3—10‰). Cea mai bogată în mitoze este seria roșie cu peste 10‰ (limite: 10—30‰). Mitograma cercetează mitozele după fazele în care se găsesc.

Numărul de mitoze nu redă destul de fidel activitatea proliferativă a măduvei. Datele de mai sus au o importanță în cercetările științifice; în practica curentă interpretarea lor poate crea uneori confuzii, așa încît se poate chiar renunța la calcularea indicilor mitotici fără prejudicii pentru calitatea mielogramei.

Studiul citologic al grunjilor medulari. Examinarea frotiului pe măduva osoasă este bine să fie dublat de studiul citologic al grunjilor medulari care păstrează în parte și anumite aspecte ale structurii histologice (317, 332). Unii autori efectuează mielogramele aproape exclusiv din grunjii striviți (132, 269, 318). Examenul citologic al grunjilor striviți și colorații panoptic prezintă 3 zone (fig. 2-26).

d. **Caracteristicile mielogramei la copil.** Mielograma la copil are limite de variație mai largi decît la adult. Cel mai important caracter al mielogramei nou-născutului și chiar a copilului în primii ani de vîrstă este *proporția crescută de limfocite*. De la naștere pînă la sfîrșitul primei luni de viață, limfocitele medulare pot reprezenta pînă la 40% din elementele nucleate. Scăderea lor se face lent, menținîndu-se o proporție de 10—20% în tot cursul copilăriei. Această limfocitoză se însoțește și de o creștere proporțională a limfoblaștilor, care nu are aceeași semnificație ca la adult. Măduva copiilor poate răspunde prin limfocitoze reactive la infecții (chiar banale) sau în diferite alte stări, de exemplu în anemia feriprivă. *Seria roșie* este de asemenea mai bogat reprezentată decît la adult, în special la sugar. *Citodiabaza* este mult mai labilă la sugar și copilul mic decît la adult; eritroblaștii pot trece ușor în sîngele periferic, ceea ce dă naștere uneori la interpretări diagnostice greșite.

Scanned with OKEN Scanner

e. **Interpretarea mielogramei și redactarea concluziilor.** Elementul cel mai important în interpretarea unei mielograme este recunoașterea și semnalarea modificărilor patologice — mai ales a celor de ordin ca-

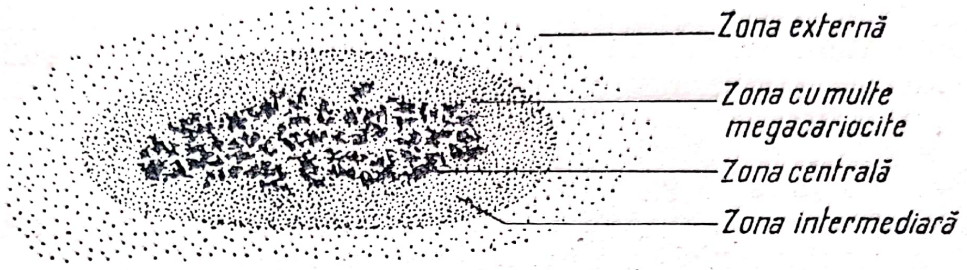


Fig. 2-26. Distribuția elementelor celulare pe frotiul sanguin prin utilizarea tehnicii de strivire a grunjilor medulari între două lame așezate în cruce.

În *zona centrală* (reticulo-endotelială), se observă fibre conjunctivo-vasculare și eventual filamente de fibrină între care se dispun cîteva celule alterate; în *zona periferică* (bogată în sînge) difuzează eritrocitele împreună cu cîteva celule hematopoietice; în această zonă se permite examinarea detaliilor morfologice ale celulelor mieloide și ale eritrocitelor; în *zona intermediară*, care conține majoritatea elementelor mieloide hematopoietice, oferă relații în legătură cu aspectul măduvei „in situ".

litativ — exprimarea procentuală a frecvenței diferitelor tipuri celulare fiind secundară ca importanță; de exemplu, în caz de megaloblastoză sau de eritremie este de mai mică importanță defalcarea statistică a celorlalte serii celulare decît semnalarea existenței patologice. Uneori poate fi necesară, chiar pentru un hematolog experimentat, efectuarea unei medulograme procentuale; ea trebuie însoțită totdeauna de concluziile examinatorului. În general, valoarea concluziilor depinde de corectitudinea examinării (foarte importantă fiind cercetarea a cît mai multe cîmpuri de frotiu), precum și de experiența și gradul de concentrare a examinatorului. Nu trebuie uitat că efectuînd o mielogramă se face o analiză a hematopoiezei acelui bolnav.

Buletinul de mielogramă trebuie să cuprindă un număr de date, din care unele se referă la tehnica punctiei, iar altele la conținutul frotiului medular. Dintre datele referitoare la tehnică este bine să se consemneze următoarele: locul unde s-a efectuat puncția (stern, spina iliacă postero-superioară etc.); rezistența osului și dacă a fost nevoie de una sau mai multe încercări pentru obținerea sucului medular; modul în care a decurs aspirarea; aspectul macroscopic al sucului medular extras, bogat sau sărac în grunji etc.).

În ceea ce privește frotiul, se vor face referiri obligatorii la cele patru puncte descrise mai sus și se va încheia cu concluziile diagnostice, de certitudine sau prezumție.

f. **Indicațiile și contraindicațiile punctiei osoase.** Dat fiind simplitatea și lipsa aproape totală de risc, puncția osoasă trebuie executată în toate cazurile în care diagnosticul hematologic nu poate fi precizat prin hemogramă sau cînd se cercetează gradul de afectare medulară. În practi-

Scanned with OKEN Scanner

carea punctiei medulare se face uneori abuz prin efectuarea ei în cazuri neindicate; alteori, dimpotrivă, ea nu se practică nici în cazurile de indicație majoră, ceea ce poate aduce mari prejudicii bolnavilor, ca în cazurile în care celulele medulare patologice apar rar pe frotiurile de sînge periferic, de exemplu în anemia megaloblastică, mielom, tezaurismoze (boala Gaucher, boala Niemann-Pick), metastaze medulare din alte organe, sau în cazurile în care se urmărește evoluția bolii în funcție de tratamentul aplicat. Existența în literatura medicală a unor cazuri (rarisime) de accidente mortale după puncții sternale nu contraindică efectuarea lor, mai ales că ele pot fi ușor prevenite. *Hemofilia reprezintă singura contraindicație majoră a mielogramei,* dar în această afecțiune mielograma nu aduce nici un aport la diagnostic.

2. PUNCȚIA BIOPSIE OSOASĂ

Prin puncție biopsie se extrage, cu ajutorul unui trocar, un cilindru de os spongios (cu conținutul său medular) care se prelucrează după tehnicile obișnuite de cercetare histologică, după decalcifiere prealabilă.

Dacă mielograma permite studiul citologic al țesutului hematopoietic, ea nu dă însă informații asupra rețelei de fibre, care nu pot fi aspirate odată cu cariocitele. Datorită vidului aspirativ și amestecului cu sînge, dispar raporturile dintre celule și chiar aprecierea densității celulare devine nesigură. Toate aceste neajunsuri ale punctiei aspiratoare sînt înlăturate de puncția biopsie, iar amîndouă împreună formează un cuplu, adesea necesar pentru un studiu precis al mielopoiezei (132, 158, 191) (fig. 2-27).

a. **Tehnici de efectuare a biopsiei.** În principiu există două grupe de tehnici: unele utilizează calea chirurgicală, altele introduc trocarul fără denudarea osului. În prezent, aceste tehnici sînt bine puse la punct; suferința provocată bolnavilor nu depășește cu mult neplăcerile punctiei osoase aspirative.

1) *Metode transcutanate:*

— *acul Türkel* extrage prin foraj obișnuit un cilindru din osul sternal cu diametrul de 1 mm;

— *trocarul Masabraud* este folosit după același principiu, însă fragmentul extras are un diametru mai mare (2—3 mm);

— *acul Westerman-Jensen* (modificat după Virn-Silverman);

— *acul Jamshidi.*

Ultimele două ace au mare răspîndire, mai ales în S.U.A. Aceste tehnici pot fi efectuate ambulator fără nici un incident.

Tehnica punctiei biopsie cu trocarul Masabraud. Locul punctiei biopsie este spina iliacă antero-superioară, dar mai ales cea postero-superioară (fig. 2-28). Pătrunderea cu trocarul se face sub anestezie locală. După ce vîrful mandrenului perforează pielea, fără să fie nevoie de incizie cutanată, mandrenul este retras și înlocuit cu trepanul dințat cu care se taie un cilindru de os spongios. Prin cîteva mișcări de rotație se desprinde fragmentul osos, care se scoate odată cu trepanul și se evacuează în flaconul cu soluție fixatoare.

Scanned with OKEN Scanner

2) *Metode prin incizie cutanată*

Trocarul Weitz modificat după trocarul întrebuinţat de Daumade (din Bordeaux în 1939), este format din 3 piese confecţionate dintr-un oţel de bună calitate.

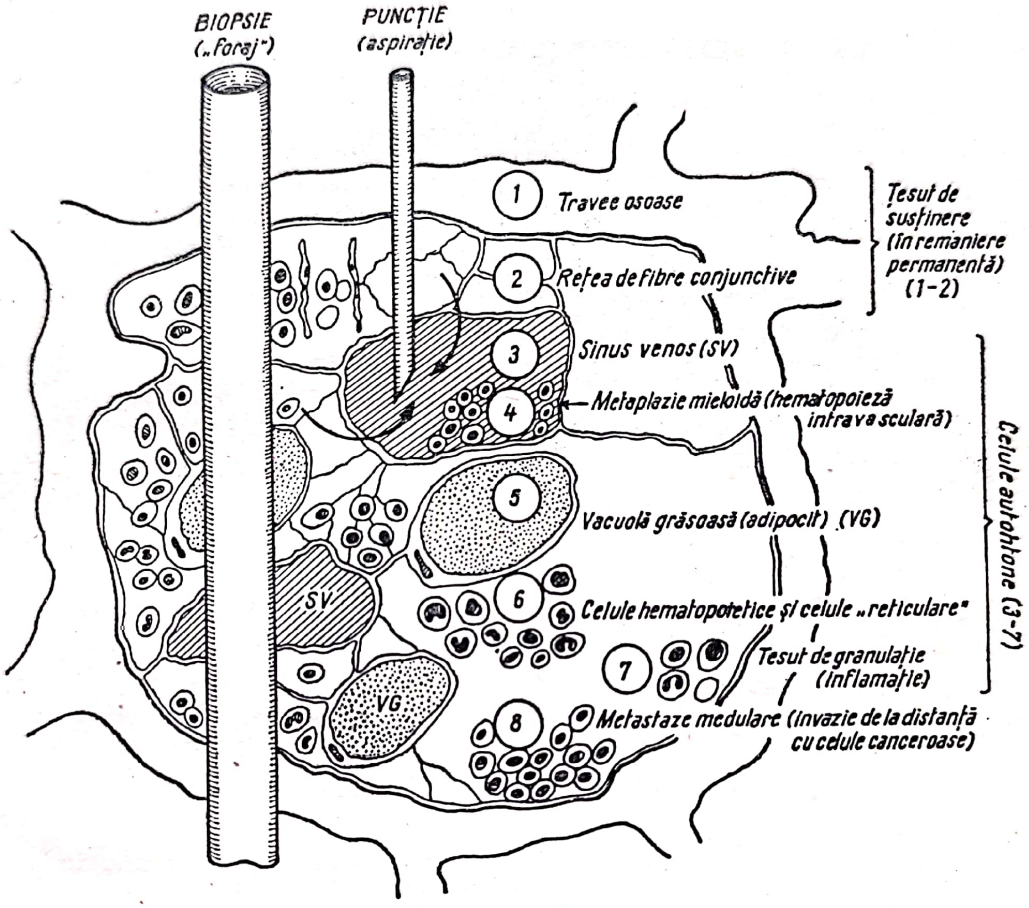


Fig. 2-27. Reprezentare schematică a structurii medulare şi a posibilităţilor de perturbare a hematopoiezei.

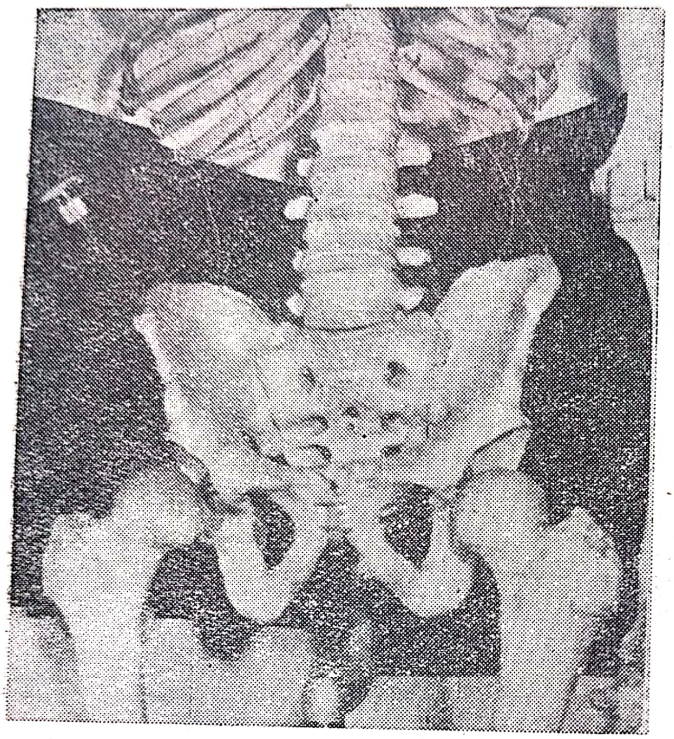
Cele două trocare redau, comparativ, modalităţile de explorare ale unei unităţi intertrabeculare: biopsia păstrează intactă poziţia componentelor medulare, în timp ce puncţia, prin vidul pe care-l creează, dislocă şi amestecă celulele din poziţia lor naturală.

Tehnica puncţiei biopsie osoasă cu trocarul Weitz. Zonele cel mai frecvent utilizate sînt osul iliac sub spina iliacă antero-superioară şi sternul, la nivelul celui de-al doilea spaţiu intercostal. Unii autori preferă prelevarea din stern întrucît acest os este mai accesibil, recoltarea este mai uşoară, reţeaua fibroasă este mai puţin strînsă decît la nivelul osului iliac, iar suprafaţa osoasă netedă este mai simplu de perforat (132). Majoritatea autorilor preferă însă osul iliac, deşi este mai greu accesibil, mai ales la persoanele grase; această zonă are avantajul că permite extragerea unui fragment osos mai lung, la nevoie putîndu-se face chiar o prelevare dublă (fig. 2-29).

Intervenţia se efectuează într-un cabinet chirurgical, în condiţii aseptice. Nu este necesară efectuarea hemostazei cu pense şi ligaturi, fiind, în general, suficientă tamponarea cu comprese sterile. Pericolul de a intra în cavitatea peritoneală este practic exclus deoarece incizia se face pe mijlocul crestei iliace.

Scanned with OKEN Scanner

Se pătrunde perpendicular pe os, aplicînd, prin mişcări semirotatorii, o anumită forţă, pînă cînd se ajunge la manşonul frenator (1 cm), care limitează penetrarea trocarului propriu-zis. În continuare se imprimă trocarului mişcări de circumducţie, cu scopul de a desprinde fragmentul de os pătruns în cilindru. Materialul conţinut este expulzat cu ajutorul mandrenului. Fragmentul osos, este luat cu o pensă; se execută cîteva amprente pe lame de sticlă dinainte pregătite. Lamele se colo-



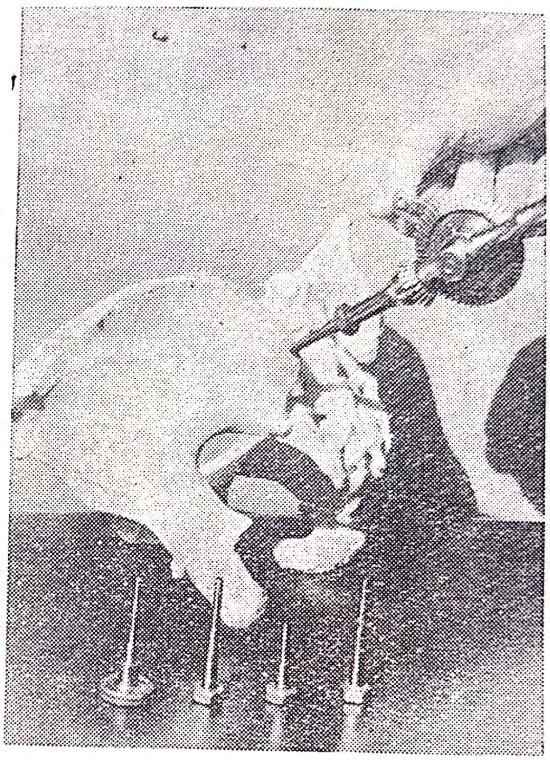


Fig. 2-28. Locurile de predilecţie a biopsiilor osoase.
Stînga: trocar tip Weitz înfipt în spina iliacă anterosuperioară (penetrare prin apăsare forţată după denudarea osoasă). *Dreapta:* trocar, inovaţie proprie; penetrare prin forare lentă în spina iliacă postero-inferioară, după formarea unei „butoniere" cutanate printr-un sistem „ac Francke".

rează panoptic. Fragmentul de biopsie se introduce în sticluţa cu soluţie fixatoare (sol. formol 10%, sol. Bouin), care se etichetează şi se trimite laboratorului de anatomie-patologică.

Orificiul din care s-a extras fragmentul de os spongios mai poate fi curăţat cu o chiuretă Volkmann mică. Din materialul recoltat se efectuează mai multe frotiuri pentru mielogramă, iar restul materialului este pus tot în sticluţa cu soluţie fixatoare. Închiderea plăgii se face după tehnica obişnuită; se aplică strîns 2 suluri de tifon confecţionate din comprese sterile peste care se pun cîteva benzi lungi de leucoplast (pansament compresiv). După 6—7 zile se scot firele, apoi se aplică un pansament uscat pentru încă 2—3 zile.

b. **Pregătirea materialului recoltat** prin biopsie pentru examenul histologic comportă o decalcifiere prealabilă. În acest scop, din soluţia fixatoare, piesa de biopsie este trecută într-o soluţie de acid azotic fumans 5% timp de cîteva ore, sau se procedează la decalcificare prin electroliză, după care se încearcă secţionarea ei. Se procedează apoi la parafinare, secţionare, montare, deparafinare şi colorare. Se efectuează cele

3 colorații de rutină sau unele din variantele lor, la care se poate adăuga colorația Perls, PAS sau colorația Giemsa;

— colorația cu hematoxilină-eozină, permite studiul celulelor (în același scop se poate efectua și colorația Giemsa);

— colorația van Gieson, sau tricrom Masson, evidențiază bine colagenul;

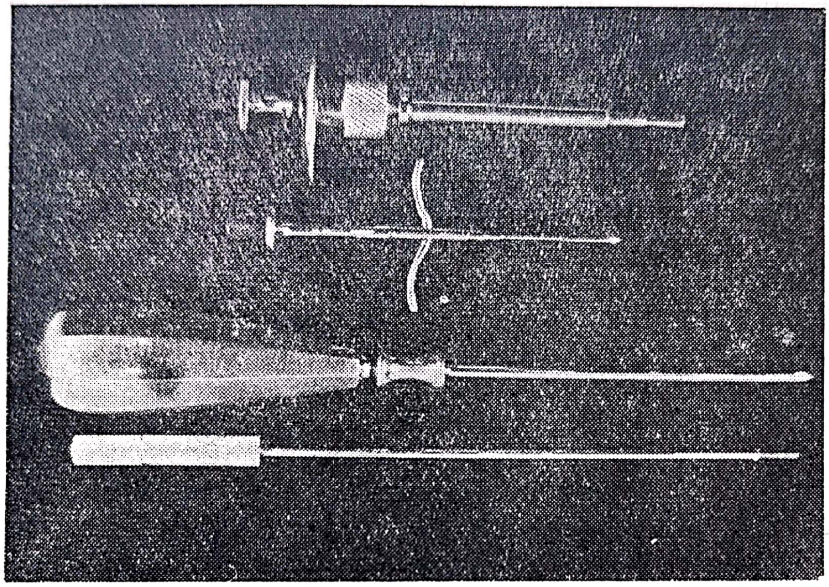


Fig. 2-29. Prezentarea comparativă a trocarului tip Weitz, alături de un ac obișnuit de puncție sternală (ambele montate) și de trocarul Masabraud (parțial montat).

— impregnația argentică pune în evidență rețeaua de reticulină;

— colorația Perls, evidențiază hemosiderina;

— colorația PAS evidențiază glicogenul.

Caracterele generale ale preparatelor histologice care trebuie luate ca bază de descriere în buletin, sînt următoarele:

— celularitatea globală a măduvei osoase;

— repartizarea omogenă sau neomogenă a țesutului hematopoietic;

— caracterul polimorf sau monomorf al cîmpurilor;

— prezența de zone particulare: insule limfoide, grupe de celule neoplazice sau alte grupe celulare (eritroblastice, granulocitare, megacariocitare, aglomerări de eozinofile etc.);

— anomalii vasculare;

— starea osului;

— dispoziția și densitatea rețelelor de reticulină și de colagen.

c. **Obiectivele, indicațiile, contraindicațiile și limitele biopsiei osoase.**

Obiectivele punției-biopsie osoasă sînt: studierea morfologiei măduvei osoase *in situ* și stabilirea participării țesutului osos și a țesutului conjunctivo-fibros la procesul de boală (38).

Indicațiile biopsiei osoase. În urma punției osoase (corect executată) este posibilă stabilirea diagnosticului în circa 90% din cazurile de hemopatii în care hemograma a furnizat date incomplete. Biopsia osoasă este

Scanned with OKEN Scanner

necesară mai ales în cazurile cînd prin puncția medulară nu se obține suc medular, ca în osteomieloscleroze, aplazii medulare și leziuni organizate ale măduvei osoase (foliculi tuberculoși, sarcoidoze, granuloame hodgkiniene, amiloidoză etc.) (71, 19). În cancere metastatice și chiar în unele hemopatii (leucemie, mielom, boala di Guglielmo), măduva poate apărea uneori „goală" la puncția aspiratoare, din cauza comprimării sinusurilor sanguine prin hiperplazia celulară, fără să existe scleroză medulară, deși aspectul ei este de măduvă „în batot".

Contraindicațiile biopsiei osoase sînt foarte puține. Dintre sindroamele hemoragice, *hemofilia reprezintă o contraindicație majoră.* Trombopeniile, chiar cu număr redus de trombocite, nu provoacă, în mod obișnuit, hemoragii importante care să contraindice efectuarea biopsiei. Este de subliniat absența hemoragiilor în numeroase cazuri cu peste 15 000 de trombocite (cu condiția ca acestea să fie de bună calitate); CID și fibrinoliza constituie încă o contraindicație a biopsiei osoase.

În afara hemoragiilor, infecția plăgii cu formare de abcese sau chiar osteomielită este teoretic posibilă.

d. **Examinarea post mortem a măduvei osoase** este, în general, nesatisfăcătoare. Pentru a avea un preparat cît mai bun de țesut medular, chiar și de cadavru, este de dorit ca prelevarea să se facă cît mai curînd după deces (la circa 3 ore); în cazurile în care acest lucru nu este posibil decît la 1—2 zile după deces, se recomandă ca materialul obținut să fie suspendat într-un mediu vîscos (albumină bovină). Întrucît țesutul medular variază în limite largi de la un os la altul, fragmentele vor fi recoltate din mai multe oase (femur, coastă, vertebre, stern etc.); evidențierea rețelei de reticulină se face astfel cu mai mult succes.

e. **Compararea rezultatelor obținute prin puncție și biopsie osoasă.** Ambele metode comportă avantaje și dezavantaje; folosite însă în combinație, ele se completează. Compararea rezultatelor pe care le oferă pot fi rezumate astfel:

— ambele metode sînt relativ puțin traumatizante;

— mielograma este rapidă, după întindere și colorare, frotiurile pot fi citite imediat, pe cînd biopsia necesită o prelucrare lungă și laborioasă, durînd circa o săptămînă;

— biopsia extrage, prin foraj, un fragment complet de țesut, căruia îi respectă arhitectura naturală (structura osoasă, rețeaua fibroasă, densitatea și topografia celulară), pe cînd mielograma, prin vidul pe care-l creează prin aspirație, imprimă sîngelui sinusal vîrtejuri care schimbă poziția naturală a celulelor;

— biopsia permite studiul lamelelor osoase și a rețelei de susținere ce adesea se asociază la modificările celulelor hematopoietice;

— biopsia nu este în măsură să ofere informații de detaliu despre celulele hematopoietice; fixatorul le retractă, iar coloranții histologici sînt mai puțin selectivi decît cei citologici;

— rezultatul de „puncție albă" nu exclude existența unei măduve cu celularitate densă, iar în anumite cazuri, ca unele forme de leucoze acute, boli limfo proliferative, aplazii medulare etc., diagnosticul nu se poate pune cu certitudine decît în urma biopsiei.

Scanned with OKEN Scanner

B. MIJLOACE INDIRECTE

Metodele indirecte de explorare a eritropoiezei sînt multiple, de la procedeele cele mai simple, ca hemograma, radiografiile osoase, pînă la metode complicate care necesită laboratoare bine utilate și personal specializat, cum sînt explorările cu izotopi radioactivi, unele metode biochimice etc. În acest capitol nu vom descrie o serie de procedee importante de explorare directă sau indirectă a eritropoiezei care au fost prezentate în alte capitole (de exemplu semnificația valorilor reticulocitare la cap. 3, pag. 204, ferokinetica la cap. 6, pag. 356, durata de viață a eritrocitelor la cap. 7, pag. 433 etc.).

1. DETERMINAREA VOLUMULUI SANGUIN

Evidențierea unei anemii sau poliglobulii se face, în practica curentă, pe baza determinării cantității de hemoglobină la 100 ml sînge, a numărului de eritrocite pe mm^3 de sînge etc., raportate la anumite condiții fiziologice (vîrstă, sex, greutate corporală). În unele situații scăderea cantității de sînge în organism nu se însoțește de scăderea hemoglobinei sau a eritrocitelor pe unitate de volum; în astfel de cazuri este necesară determinarea volumului sanguin. Determinarea volemiei se face pe cale directă, sîngerîndă (aplicabilă numai la animalele de experiență) și pe cale indirectă, aplicabilă și la om.

Cu ajutorul metodelor directe, vechii fiziologi (Welker, 1954 și alții) au reușit să determine volumul sanguin la diverse animale. Metoda nu are decît o valoare istorică deoarece astăzi, chiar și la animale, se utilizează metodele moderne indirecte.

Metodele indirecte prin injectare de indicatori urmăresc determinarea volumului eritrocitar în totalitate; ele sînt mai laborioase și nu reprezintă metode curente de investigație în laboratorul clinic, în afara unor laboratoare cu utilare ultramodernă.

Volumul total (eritrocitar sau plasmatic) rezultă din raportul dintre cantitatea de substanță injectată și diluția ei, după amestec, în circulație. Volumul sanguin total se calculează apoi în funcție de hematocrit după formula:

$$\text{Volumul sanguin} = \text{volumul plasmatic} \times \frac{100}{100 - \text{Ht.}} \text{ sau}$$

$$\text{Volumul sanguin} = \text{volumul eritrocitar} \times \frac{100}{\text{Ht.}}$$

Aceste procedee se bazează pe măsurarea diluării unor indicatori (coloranți sau substanțe radioactive) care se fixează pe eritrocite sau rămîn în plasmă. Pentru ca o substanță să poată fi folosită ca indicator în determinarea volumului sanguin, trebuie să persiste un anumit timp nemodificată în spațiul pe care îl măsoară (adică să nu treacă în spațiul interstițial sau din plasmă în eritrocite și vice versa), să nu fie excretată,

Scanned with OKEN Scanner

fagocitată sau adsorbită pe celule, să nu fie metabolizată (chiar numai parţial) şi în sfîrşit, să nu fie toxică pentru organism.

Metodele prin injectare de substanţe colorante au pierdut din interes, odată cu introducerea metodelor cu izotopi.

Metodele prin injectare de izotopi radioactivi sînt cele mai sigure şi mai rapide de determinare a volumului sanguin. Pînă în 1944 fiziologii, hematologii, medicii reanimatori şi alţi specialişti, nu dispuneau decît de tehnici greoaie, de lungă durată şi prea puţin precise. Astăzi, aparate de mare fineţe ne permit măsurarea rapidă a volumului sanguin, cu ajutorul izotopilor radioactivi. Cu aceste metode se determină, fie volumul eritrocitar, fie volumul plasmatic; volumul sanguin global se calculează pe baza hematocritului (169).

Pentru determinarea volumului sanguin global se poate măsura concomitent volumul eritrocitar şi cel plasmatic cu doi indicatori radioactivi diferiţi, însumîndu-se apoi cele două valori. Pentru măsurarea concomitentă a volumului plasmatic şi eritrocitar, cel mai bine se pretează serumalbumina umană marcată cu ^{131}I şi eritrocitele marcate cu ^{51}Cr, deoarece ambii izotopi radioactivi pot fi detectaţi independent unul de altul pe baza energiei lor diferite (tehnica dublei marcări). Pentru astfel de determinări s-au perfectat astăzi instrumente de măsurat complet automatizate, de mare precizie.

Volumul eritrocitar global se determină cu crom radioactiv.

Radiocromul 51 a fost propus, pentru astfel de determinări, în 1950 de către Gray şi Sterling; urmărirea lui în sînge se face cu ajutorul detectorului de raze gama cu scintilaţie. Cromul anionic hexavalent sub formă de cromat de Na ($Na_2{}^{51}CrO_4$) pătrunde în eritrocit şi se leagă, o parte de fracţiunea proteică a membranei eritrocitare, iar altă parte de globină; el se transformă totodată în crom trivalent; sub formă de clorură de crom ($CrCl_3$), care nu mai poate părăsi eritrocitul, iar după hemoliza acestuia, substanţa eliberată nu mai poate străbate membrana altor eritrocite. Cantitatea de substanţă radioactivă necesară este atît de mică, încît nu exercită nici o acţiune toxică secundară asupra organismului. Timpul de înjumătăţire de 27,8 zile şi energia gama de 0,33 MeV fac ca cromul radioactiv să poată fi folosit şi în explorarea duratei de viaţă a eritrocitelor (vezi pag. 434).

Volumul plasmatic, se determină după acelaşi principiu. Indicatorul utilizat este albumina marcată cu radioiod 131. Albumina prezintă însă inconvenientul că părăseşte destul de rapid patul vascular pentru a se amesteca cu lichidul extracelular. De aceea, la determinarea volumului plasmatic, trebuie recoltate mai multe probe; trecute pe un grafic, aceste rezultate înscriu o curbă exponenţială, exprimată semilogaritmic sub forma unei drepte; ea permite determinarea prin extrapolare a timpului zero.

Deşi metoda comportă un anumit grad de eroare, motiv pentru care, în general, nu este preferată pentru determinarea volumului sanguin, acest procedeu îşi găseşte indicaţia principală în cazurile de urgenţă medico-chirurgicală. Nefiind necesară centrifugarea sîngelui, determinarea poate fi efectuată chiar în sala de urgenţă; rezultatul se obţine în aproximativ 15 minute. Metoda necesită însă un aparat semiautomat, precum şi preparatul de albumină marcată, furnizat în truse speciale, siringi, pentru uz unic, ace siliconate şi tuburi heparinate. După 10 minute de la injectarea albuminei marcate se extrage sînge din altă venă; calculul radioactivităţii se face automat, iar rezultatul citit arată direct volumul sanguin. În afară de traumatologie, unde este importantă o determinare corectă a cantităţii de sînge, necesare pentru transfuzii (frecvent subestimată), metoda poate fi utilizată în afecţiuni medicale, ca maladia Vaquez, insuficienţele respiratorii cronice şi altele.

Scanned with OKEN Scanner

2. CONSTANTE ŞI INDICI ERITROCITARI

Unele caracteristici ale eritrocitelor, ca număr, volum, diametru, încărcare cu hemoglobină şi altele, au valori constante; devierile de la ele oferă, de cele mai multe ori, indicii importante pentru diagnostic (17, 99, 168).

După modul de determinare, *constantele eritrocitare* pot fi *directe* (de exemplu diametrul eritrocitar mediu, hematocritul) şi *derivate* (de exemplu volumul eritrocitar mediu, hemoglobina eritrocitară medie etc.), care se calculează din constante directe ca hematocritul, numărul de eritrocite, hemoglobina etc. (168, 187).

Spre deosebire de constantele eritrocitare, care se exprimă în unităţi de măsură ale mărimilor respective, indicii eritrocitari reprezintă aceleaşi mărimi, raportate la valoarea considerată normală, cifra normală fiind deci în jur de unu (tabelul 2-1).

Tabelul 2-1

Valorile normale ale aparatului eritrocitar.
Modificat după M. Wintrobe şi Y. Najean—J. Bernard

1. *Număr de eritrocite*

La naştere	4,1—6,1 milioane	(m. 5,1)
Între 15 zile şi 2 luni	3,8—5,6 „	(„ 4,7)
Între 3 şi 6 luni	3,8—5,2 „	(„ 4,5)
La 4 ani	4,0—5,2 „	(„ 4,6)
La 10 ani	4,1—5,3 „	(„ 4,7)
Femeie adultă	4,2—5,4 „	(„ 4,8)
Bărbat adult	4,6—5,8 „	(„ 5,2)

2. *Cantitatea de hemoglobină*

La naştere	19,5 g%
Între 15 zile şi 2 luni	14,0 g%
Între 3 şi 6 luni	12,5 g%
La 4 ani	12,5 g%
La 10 ani	13,0 g%
Femeie adultă	14,5±1 g%
Bărbat adult	15 ±1 g%

3. *Hematocrit*

La naştere	52% — ±4
Copil	37% — ±3
Femeie adultă	42% — ±2
Bărbat adult	45% — ±3

4. *Volumul sanguin*

Femeie adultă*	— volum total	62—75 ml/kg
	— volum eritrocitar	23—28 ml/kg
Bărbat adult*	— volum total	65—75 ml/kg
	— volum eritrocitar	27—33 ml/kg
La naştere	— volum total	85—90 ml/kg
Sfîrşitul sarcinii	— Volumul total creşte cu 10—14%	
	— Volum eritrocitar: creştere discretă sau nulă de unde anemia aparentă.	

* Valori valabile pentru o înălţime de 155—190 cm şi o greutate de 45—85 kg

Scanned with OKEN Scanner

a. **Constante eritrocitare directe**

1) *Numărarea eritrocitelor* constituie metoda cea mai „populară" de depistare și determinare a gradului anemiei. Nu numai persoanele nemedicale, dar și mulți medici văd în numărarea eritrocitelor unul din examenele de laborator de bază. Oboseala, asteniile și indispozițiile de diverse cauze sînt atribuite, de multe ori, unui grad de „anemie" chiar în afara oricăror indicii clinice în acest sens (tegumente și mucoase normal colorate, țesuturi eutrofice etc.). Determinarea numărului de eritrocite este însă unul din examenele hematologice cel mai puțin precise, motiv pentru care nu se mai utilizează în numeroase unități de specialitate, fiind înlocuită cu determinarea hemoglobinei (în g%) și a hematocritului.

În principiu, eritrocitele se numără la microscop după diluarea convenabilă a unui mic eșantion de sînge, într-o cameră cu o înălțime precis determinată, a cărei suprafață este împărțită în cîmpuri de mărime cunoscută. Erorile la numărarea eritrocitelor pot fi legate de diferiți timpi ai determinării sau de aparatură.

Erorile de recoltare pot ține de efectuarea unei înțepături prea mici, care necesită apăsarea forțată a degetului pentru obținerea picăturii de sînge, manevră ce duce la diluția sîngelui cu lichid interstițial sau de înțeparea într-o zonă cu un regim circulator și concentrație eritrocitară modificată (edem, cianoză, vaso-constricție);

Erorile de aparatură pot ține fie de pipetă (defecte de calibrare, știrbituri), fie de camera de numărat (defecte de fabricație cu determinarea imprecisă a înălțimii spațiului de numărat), fie de folosirea unor lamele prea subțiri care prin incurbare modifică înălțimea camerii.

Erorile de tehnică pot avea cauze foarte importante:

— folosirea unor pipete sau camere de numărat murdare sau ude;

— recoltare întîrziată cu aglutinarea eritrocitelor înainte de diluția sîngelui în pipetă;

— nerespectarea liniilor indicatoare pentru coloana de sînge și pentru diluant;

— omiterea ștergerii de sînge a vîrfului pipetei;

— introducerea de bule de aer în pipetă;

— introducerea în camera de numărat a primei picături din pipetă care conține mai puțin sînge;

— lipsa de răbdare în efectuarea unui amestec bun al sîngelui cu soluția diluantă;

— umplerea greșită a camerei de numărat;

— întîrzierea numărătorii, cu ținerea timp îndelungat a camerei de numărat încărcate la temperatura laboratorului sau lîngă o sursă de căldură (ceea ce are ca rezultat evaporarea lichidului și concentrarea probei);

— greșeli de numărătoare, din grabă sau superficialitate, ori din cauza unor condiții nefavorabile de lucru în laborator (conversație, zgomot, agitație).

Chiar cu respectarea strictă a regulilor prescrise rămîne un coeficient de eroare dat de distribuția neomogenă a eritrocitelor în camera de numărat. Dat fiind că la un sînge normal (5 milioane E) se numără cu tehnica obișnuită circa 500 de eritrocite, iar fiecare eritrocit numărat în plus sau în minus reprezintă o cifră de 10 000, care se adaugă sau se scade din cifra finală, o bună omogenizare a suspensiei este un lucru hotărîtor. Eroarea datorită repartiției inegale în cameră poate fi redusă prin numărarea unui număr mai mare de eritrocite; ea variază invers

Scanned with OKEN Scanner

cu pătratul cifrei acestora. Din datele publicate de Biggs și MacMilan, cu tehnici excelente, eroarea poate fi redusă la aproximativ 8%. În mod obișnuit ea se situează la 10—15%, iar în cazurile în care conștiinciozitatea tehnicienilor lasă de dorit, ajunge la 20—30% sau chiar mai mult.

Interpretînd rezultatele în funcție de o eroare de 8%, se poate spune că la un individ cu cifră reală de 5 000 000 de eritrocite pe mm³, la care

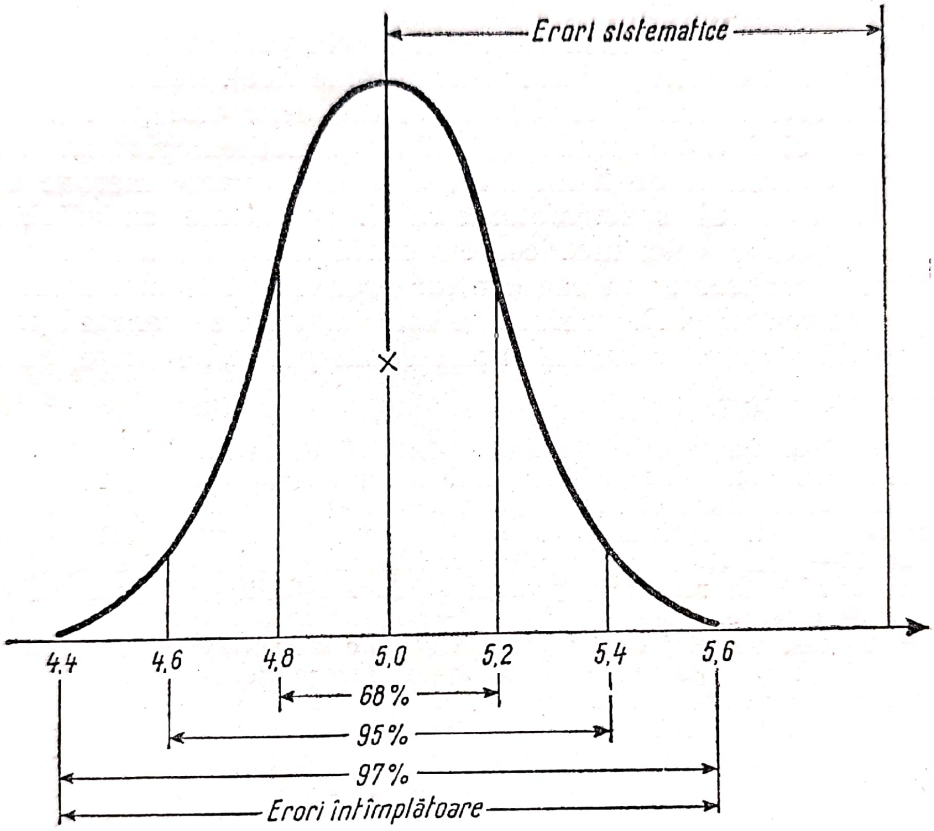


Fig. 2-30. Reprezentare grafică (curbă tip Gauss) a cifrei eritrocitare și a erorilor derivate în urma numărării de 100 de ori (prin înțepătura digitală) a eritrocitelor unei persoane sănătoase (după S. Solomon și C. Comoroșan).

Legenda: x=cifra reală (în cazul nostru 5 000 000 de eritrocite pe mm³). Derivația standard=2 (în cazul nostru eroarea la o determinare este de 200 000 de eritrocite). Erorile mici sînt mai probabile decît cele mari.

se fac 100 de determinări paralele, în circa 95% din cazuri se vor obține rezultate cuprinse între 4 600 000 și 5 400 000, majoritatea cifrelor situîndu-se în jur de 5 000 000 (curba Gauss), dar în același timp circa 5% din rezultate se vor situa chiar în afara acestor limite (fig. 2-30).

Pentru scăderea, pe cît posibil, a acestei surse de eroare, se recomandă recoltarea sîngelui în 2 pipete și numărarea în 2 hemocitometre. Dacă diferențele nu depășesc 2% din limita variațiilor fiziologice, eroarea se consideră acceptabilă.

2) *Determinarea cantității de hemoglobină.* Tulburările provocate de anemie depind de concentrația scăzută a hemoglo-

Scanned with OKEN Scanner

binei în sînge; aceasta fiind cea mai importantă dintre constantele eritrocitare.

Prin rapiditatea, ușurința de execuție și prin precizia rezultatelor, dozarea hemoglobinei a devenit un test de triaj în decalarea stării de anemie; abia după efectuarea acestui test de orientare se trece la investigații mai detaliate, printre care și numărarea eritrocitelor. Deoarece determinarea directă a hemoglobinei în stare pură, nu este posibilă ca atare, se recurge la metode indirecte.

Metodele de hemoglobinometrie sînt foarte variate (gazometrice, densimetrice, chimice, colorimetrice, spectrofotometrice). Pentru determinarea hemoglobinei este necesară eliberarea ei din eritrocite prin hemoliză și transformarea ei într-un produs stabil (cianmethemoglobină, hemoglobină redusă, clorhidrat de hematină). Cele mai exacte metode sînt cele efectuate cu ajutorul spectrofotometrului. Rezultate satisfăcătoare se obțin și cu metode colorimetrice, cu condiția să fie aleasă o tehnică verificată și recunoscută; în caz contrar erorile pot fi mai mari decît la numărarea eritrocitelor. Determinările colorimetrice se bazează pe compararea intensității culorii soluției obținute din proba de sînge, cu aceea a unui etalon cunoscut.

O metodă încă des utilizată în unele laboratoare din țara noastră este metoda Sahli, cu transformarea hemoglobinei în hematină acidă, de culoare brună, prin tratare cu acid clorhidric 0,1 N. Această metodă foarte simplă și rapidă, se bazează pe compararea culorii obținute, cu aceea a etalonului de sticlă colorată; ea poate da erori de 10—15%, ținînd de modificarea intensității culorii soluției în prima jumătate de oră de la recoltare, precum și de sensibilitatea aprecierii vizuale a intensităților de culoare.

Pentru un test de triaj de importanță atît de mare, aceste erori sînt considerate intolerabile, motiv pentru care Comitetul Internațional pentru Standardizare în Hematologie a recomandat o metodă mai precisă, anume determinarea fotometrică a hemoglobinei sub formă de cian-methemoglobină cu ajutorul soluției Drabkin. Pentru țara noastră soluția standard de hemoglobină este livrată de Centrul de Hematologie din București. Se recomandă ca laboratoarele care o mai practică să renunțe la metoda Sahli și să treacă la folosirea metodei cu cian-methemoglobină. Cu această metodă rezultatele depind de o bună etalonare a fotometrului; o greșeală de etalonare se repercută asupra tuturor determinărilor din seria respectivă; în acest scop fotocolorimetrele vor fi controlate periodic; o altă sursă de eroare poate fi degradarea soluției standard. Sursele de eroare ținînd de recoltare trebuie luate și aici în considerare.

Valorile normale ale hemoglobinei sînt redate în tabelul 2-1. Hemoglobina nu trebuie exprimată în procente deoarece acestea reprezintă raportarea valorii obținute față de o valoare fixă, considerată normală, fără să țină seama de sex, vîrstă și alte cauze de variație.

Exprimarea „tradițională" a gradului de anemie sau poliglobulie este redată mai ales în cifre eritrocitare care sînt însă examenele cele mai puțin reprezentative și mai supuse erorilor. Orice personal medical, pentru început, iar mai tîrziu fiecare persoană nemedicală, va trebui să se obișnuiască cu exprimarea hemoglobinei în grame la 100 ml. de sînge total și cu valorile hematocritului. Acest raport este cu atît mai simplu cu cît valorile absolute, precum și cele procentuale rezultate din indici, pot fi calculate mintal cu multă ușurință, mai ales dacă se fixează anumite repere ca: Hb. 100%=16 g; 50%=8 g; 25%=4 g și 75%=12 g, 1 g de Hb reprezentînd 6,25% (tabelul 2-2).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 2-2

Echivalențele conținutului de hemoglobină exprimate prin două sisteme de referințe: g la 100 ml sînge și procent față de o valoare fixă de 16 g% (respectiv 100%), considerată concentrația ideală la un bărbat tînăr sănătos.

g Hb%	%	g Hb%	%	g Hb%	%
1	6,25	9	56,25	17	106,25
2	12,50	10	62,50	18	112,50
3	18,75	11	78,75	19	118,75
4	25	12	75	20	125
5	31,25	13	81,25	21	131,25
6	37,50	14	87,50	22	137,50
7	43,75	15	93,75	23	143,75
8	50	16	100	24	150

3) *Hematocritul* exprimă, în procente, volumul ocupat de eritrocite într-o probă de sînge. Determinarea lui se face prin centrifugare după ce, în prealabil, sîngele a fost făcut incoagulabil. Pentru a nu influența volumul plasmatic se folosește numai anticoagulant uscat. Centrifugarea nu poate fi înlocuită cu sedimentarea simplă (chiar timp de 24 de ore), deoarece în această situație eritrocitele lasă între ele spații importante ocupate de plasmă (cifra hematocritului astfel obținut este mai mare decît prin centrifugare). Chiar după o centrifugare optimă eritrocitele mai cuprind încă între ele 4—8% plasmă; dacă se forțează centrifugarea, eritrocitele se pot altera, astfel încît, o parte din conținutul lor poate fi deplasat în afara membranei acestora. Pe de altă parte raportul dintre plasmă și elementele figurate nu este același în toate sectoarele circulației sanguine.

Hematocritul venos reprezintă raportul dintre elementele figurate sanguine și plasmă, determinat pe sînge recoltat din venă. Prin măsurarea simultană a volumului plasmatic total și a volumului eritrocitar global se obține hematocritul somatic (cu ceva mai mic decît hematocritul venos). Această diferență este dată de repartizarea diferită a eritrocitelor și a plasmei în diverse viscere și în sîngele venos periferic (46). Pentru a obține hematocritul somatic din cifra hematocritului venos, aceasta trebuie înmulțită cu factorul de corecție 0,87 care rezultă din înmulțirea factorului 0,96 (=corecția pentru hematocritul somatic) cu factorul 0,91 (corecția pentru plasma rămasă între eritrocite după centrifugare). Cu ajutorul cifrelor Hb se poate calcula volumul eritrocitar mediu (VEM) și concentrația medie de hemoglobină pe eritrocit (CHEM).

La naștere hematocritul este mai ridicat decît la adult (circa 53%). Acest fapt se datorește, atît hemoconcentrației, cît și macrocitozei fiziologice (eritrocite cu diametrul de 8,5 μ și volum mediu de 110 μ^3). După săptămîna a 3-a volumul eritrocitar scade net, iar hematocritul scade și el, încît în luna a 3-a există o microcitoză și o hipocromie cu un hematocrit de 33—36% (187).

Scanned with OKEN Scanner

Determinarea hematocritului trebuie introdusă ca test de triaj în toate stările în care este bănuită o anemie sau o poliglobulie. Spre deosebire de numărătoarea de eritrocite, hematocritul este o metodă mult mai precisă; executarea lui este aproape lipsită de erori, iar coeficientul de variație este sub 2%.

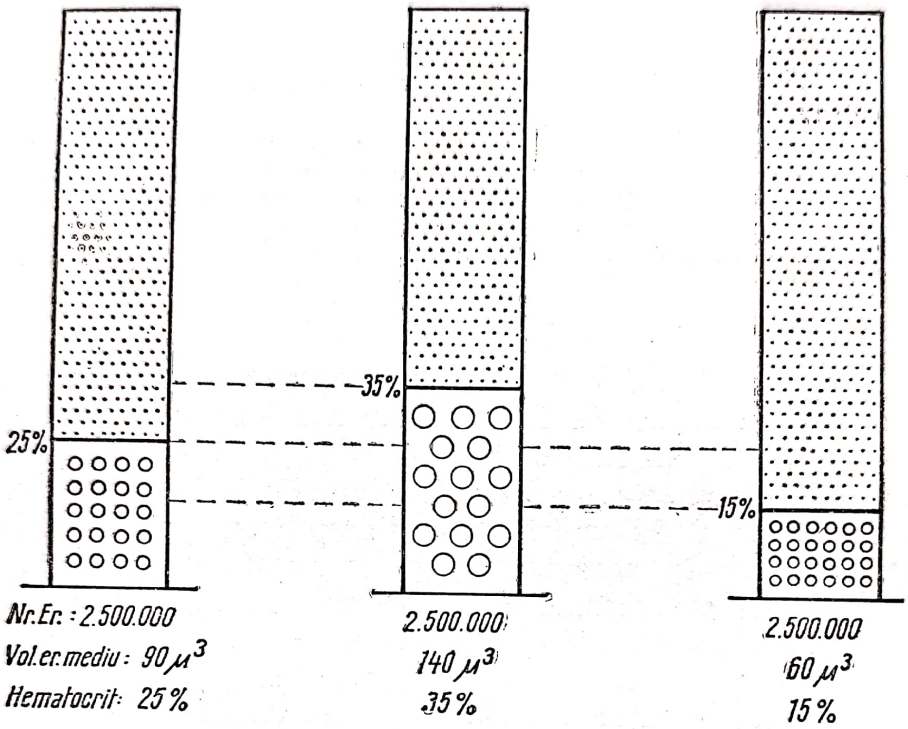


Fig. 2-31. Reprezentare figurată a raporturilor dintre numărul de eritrocite, volumul acestora și hematocrit în anemiile normocitare, macrocitare și microcitare.

Patologic hematocritul scade în hemodiluții și în anemii, mai ales în anemiile microcitare și crește în caz de hemoconcentrație și poliglobulii; pentru a avea rezultate precise, este necesară și determinarea masei eritrocitare totale (46) (fig. 2-31 și fig. 2-32).

Variații fiziologice ale constantelor eritrocitare directe. Dacă se controlează la același individ, de mai multe ori pe zi, constantele eritrocitare, se obține o curbă de tip gaussian, cu atît mai strînsă, cu cît se respectă mai riguros indicațiile tehnice de executare a lor.

În afară de limitele largi, arătate în tabelul 2-1, circa 5% din populație poate să prezinte valori sub limitele considerate normale, fără să se găsească nici un element patologic, nici în momentul determinării, nici ulterior, motiv pentru care unii autori dau limite și mai largi pentru cifrele apreciate ca fiziologice. La considerarea acestor cifre trebuie însă să fie excluse posibilitățile de eroare.

V a r i a ț i i l e g a t e d e s e x. Între valorile obținute la cele două sexe există diferențe care au o legătură incontestabilă cu perioada de activitate genitală. Ele nu se observă, nici înainte de pubertate, nici

după climacteriu. Există mai multe explicații care s-au dat acestor variații.

Ciclul menstrual și sarcinile duc la un anumit grad de carență marțială care determină scăderea eritropoiezei. Deoarece hipocromia nu apare decît dacă fierul scade sub anumite limite, scăderea numărului de eritro-

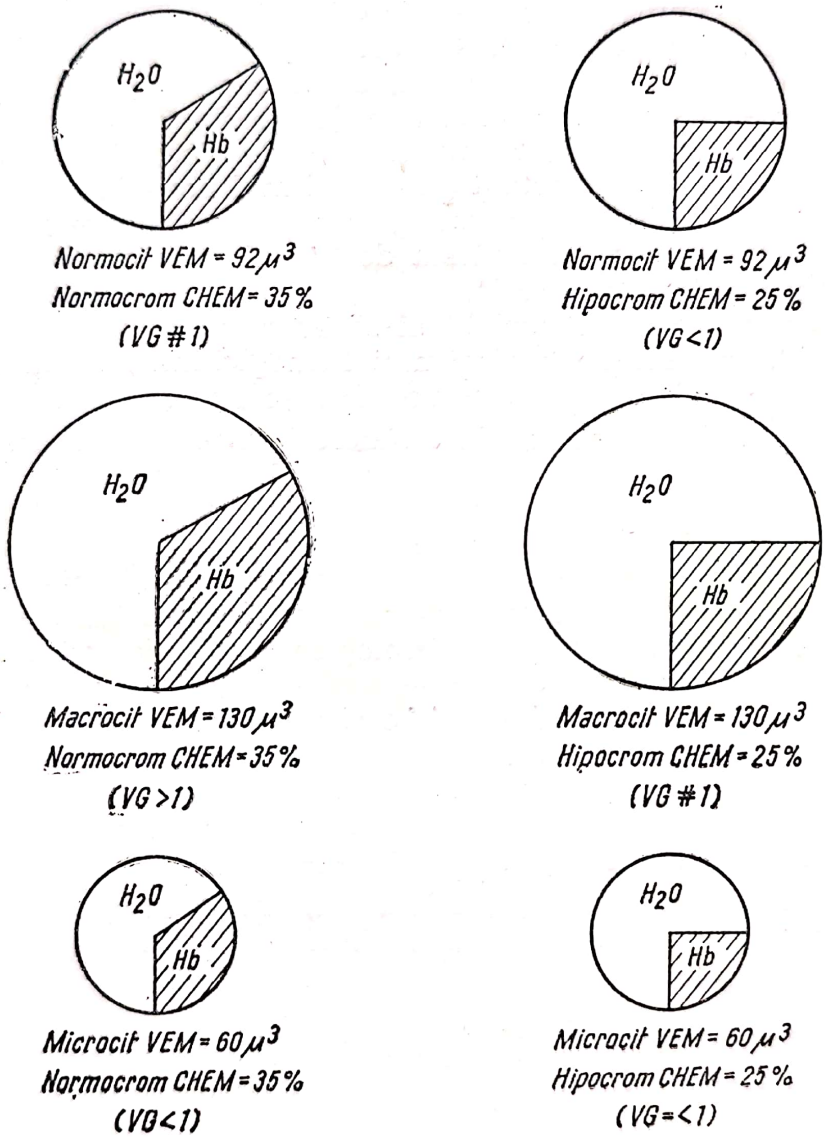


Fig. 2-32. Compararea „valorii globulare" (VG) cu concentrația hemoglobinei eritrocitare medii (CHEM) în condiții de variații ale mărimii eritrocitare (după A. Goguel, 1972).

cite este, în general, paralelă cu scăderea hemoglobinei. La mamiferele care nu prezintă sîngerări menstruale nu există diferențe între cele două sexe în ce privește valorile eritrocitare sau de hemoglobină.

Deosebirile mai depind de acțiunile diferite ale hormonilor respectivi asupra sîngelui: foliculina, prin tendința ei de a reține apa în organism,

Scanned with OKEN Scanner

provoacă o anumită diluţie a eritrocitelor în masa circulantă, pe cînd hormonii androgeni, care au o acţiune stimulatoare asupra eritropoiezei, au un efect contrar.

Variaţii legate de vîrstă. Variaţii ale constantelor eritrocitare se constată la cele două extreme ale vîrstelor, dar mai ales în prima parte a vieţii.

Sîngele fetal conţine un număr de eritrocite mai mare decît la adult (circa 5—7 milioane pe mm^3). Uneori în prima oră de viaţă apare un anumit grad de poliglobulie, urmarea modificării raportului dintre eritrocite şi plasmă, putînd duce la semne de suferinţă respiratorie. În cordonul ombilical numărul de eritrocite este de circa 5 200 000 pe mm^3, iar în orele următoare se constată (în organismul nou-născutului) o uşoară creştere (5 800 000 pe mm^3), pentru ca în zilele următoare să apară, progresiv o scădere uşoară. La vîrsta de 3 luni numărul de eritrocite se apropie de 4 000 000 pe mm^3 (117).

La naştere valoarea hemoglobinei oscilează între 16,5 şi 23,5 g% (în medie 20 g%). În primele 3 săptămîni hemoglobina rămîne crescută; o scădere a acesteia sub 14,5 g% este un semn cert de anemie.

În ceea ce priveşte variaţiile (scăderea) constanţelor eritrocitare la bătrîni, ele nu sînt acceptate de toţi autorii; unii le contestă invocîndu-se că statisticile existente sînt făcute pe loturi de bătrîni spitalizaţi în serviciile de geriatrie trăind în condiţii de viaţă şi alimentare anormale. Este ştiut că proporţia dintre măduva roşie şi măduva galbenă, scade la bătrîni; din această cauză homeostazia eritrocitară a omului bătrîn coboară mai uşor sub valorile fiziologice, în caz de solicitări crescute, decît la individul tînăr.

Variaţii legate de diferenţele orare şi de activităţile fiziologice. Nu există variaţii diurne legate de ora solară; diferenţele mici care au fost semnalate sînt legate de activitatea cotidiană (fizică, intelectuală, alimentaţie etc.); ele au mai mult o valoare teoretică, fără importanţă pentru practica curentă.

Alimentaţia influenţează în foarte mică măsură valorile eritrocitare încît nu este justificată condiţia de a se recolta hemograma pe nemîncate.

În unele spitale se mai obişnuieşte practica de a amîna efectuarea hemogramei la bolnavii care au ingerat, cu 1—2 ore înainte, de exemplu, o cană de ceai cu biscuiţi, mărindu-se, prin aceasta, inutil numărul zilelor de spitalizare şi întîrzierea rezultatelor bilanţului biologic.

Activitatea fizică susţinută influenţează eritropoieza în sensul unei producţii crescute de eritrocite, urmare creşterii schimburilor metabolice. Activitatea fizică tranzitorie şi chiar exerciţiile sportive nu modifică semnificativ rezultatul hemogramei.

Deplasarea tehnicianului de laborator la patul bolnavului este justificată de mai multe motive organizatorice (evitarea aglomerării, păstrarea liniştei necesară în laboratoare etc.) şi pentru a cruţa bolnavii să se deplaseze sumar îmbrăcaţi în anotimpuri reci, uneori la distanţe mari şi la laboratoare care nu sînt uşor accesibile, dar mai ales pentru a nu supune persoane debilitate la eforturi suplimentare.

Scanned with OKEN Scanner

Factorii psihici pot să producă creşteri ale numărului de eritrocite de exemplu în caz de emoţii puternice sau la bolnavii cu labilitate nervoasă.

Cifrele indicate în tabelul 4-9 sînt cifre normale, întîlnite în 98% din populaţia sănătoasă în cadrul vîrstei şi sexului indicat. Restul de 2% din indivizii adulţi, prezintă valori situate peste, sau sub cifrele arătate, deşi sînt clinic sănătoşi.

b. **Constantele eritrocitare derivate** se calculează din valorile constantelor directe. Dintre constantele derivate unele au o valoare practică reală, astfel volumul eritrocitar mediu (VEM), hemoglobina eritrocitară medie (HEM) şi concentraţia medie de hemoglobină pe eritrocit (CHEM) pe cînd altele, ca grosimea eritrocitară medie (GEM), suprafaţa eritrocitară medie (SEM) etc. se utilizează doar în unele cercetări ştiinţifice.

Deoarece constantele eritrocitare derivate se calculează pe baza valorilor de hemoglobină, a numărului de eritrocite şi a hematocritului, exactitatea lor depinde de precizia cu care s-a efectuat determinarea constantelor directe.

1) *Volumul eritrocitar mediu* (VEM). Această constantă derivată se obţine împărţind volumul eritrocitar global (determinat prin hematocrit), cu numărul de eritrocite, după formula:

$$VEM = \frac{Ht \times 10}{E}$$; valoare medie: = 87 μ^3 (limite: 80—94 μ^3).

În anemiile microcitare VEM poate scădea sub 70 μ^3 iar în cele megalocitare poate creşte la 120 μ^3 sau chiar la 140 μ^3.

2) *Hemoglobina eritrocitară medie* (HEM). Această constantă, care reprezintă încărcarea medie cu hemoglobină a unui eritrocit şi se exprimă în micro-micro-grame ($\gamma\gamma$ sau $\mu\mu$g, sau picograme — pg), se calculează din cantitatea de hemoglobină la 100 ml sînge şi din numărul de eritrocite pe mm^3, după formula:

$$HEM = \frac{Hb \times 10}{E}$$; valoare medie: 30 $\mu\mu$g (limite: 25—35 $\mu\mu$g).

Scăderi ale HEM, sub limitele normale se întîlnesc în anemiile hipocrome; creşterile sînt însoţite totdeauna de creşterea VEM.

Deoarece HEM rezultă din două constante eritrocitare a căror determinare este grevată de erori destul de importante, ea este, la rîndul ei, cea mai puţin exactă dintre constantele eritrocitare.

3) *Concentraţia medie a hemoglobinei eritrocitare* (CHEM). Această constantă, care exprimă concentraţia hemoglobinei pe unitatea de volum de masă eritrocitară, se calculează din cifra de hemoglobină (în g%) şi volumul eritrocitar (Ht) după formula:

$$CHEM = \frac{Hb \times 100}{Ht}$$; valoare medie = 33 g% ml (limite: 30—36 g%).

Menţionăm că CHEM nu exprimă procente de Hb din valorile constantelor normale, nici canitatea de Hb la 100 ml sînge (ambele utilizate la determinarea hemoglobinei), ci cantitatea de Hb (în grame) pe unitatea de volum (100 ml) de masă eritrocitară.

Creşteri ale CHEM peste 36% nu există; eritrocitul are în mod normal, o saturaţie maximală cu hemoglobină; creşterile înregistrate de HEM şi de indicele de culoare se datoresc creşterilor de volum ale eritrocitelor, motiv pentru care este preferabilă determinarea CHEM (care nu este influenţată de volumul eritrocitar). Scăderile sub 32 g% indică o încărcare redusă a eritrocitelor cu hemoglobină şi se întîlnesc în anemiile hipocrome.

c. **Indicii eritrocitari** reprezintă, în general, o altă formă de exprimare a constantelor eritrocitare şi anume prin raportarea valorii găsite, la valoarea considerată normală; rezultatele se situează în jurul cifrei 1.

Cel mai răspîndit indice eritrocitar este indicele de culoare cunoscut şi sub denumirea eronată de valoare globulară. Acesta rezultă din raportarea valorii de hemoglobină obţinută la valoarea normală, considerată a fi egală (cu 16 g/100). Calculul se face după formula:

$$\frac{\text{Nr. E (în milioane)} \times 20}{\text{Hb (în procente)}} \quad \text{sau} \quad \frac{\text{Nr. E (în milioane)} \times 3{,}2}{\text{Hb (în g/100)}}$$

Critica utilizării „valorii globulare". Calculul valorii globulare este simplu şi comod; exprimarea rezultatului este şi el foarte sugestiv, dar în acelaşi timp pretează la interpretări incorecte. Însăşi expresia de „valoare globulară" este neadecvată, fiind mai potrivită denumirea de indice de culoare (IC). Deoarece acest indice nu ţine seama de volumul eritrocitar, creşterea lui crează ideea falsă de „hipercromie", ceea ce nu corespunde realităţii, creşterea cantităţii de Hb în eritrocit fiind consecinţa exclusivă a creşterii volumului eritrocitar, nu a unei încărcări „suplimentare" cu Hb. Pe de altă parte, determinarea IC comportă mai mulţi factori de eroare decît calcularea unor constante eritrocitare (CHEM). Inconvenientul principal al indicelui de culoare constă însă în faptul că raportează cantitatea de hemoglobină, găsită la pacient, cu o anumită valoare fixă, presupusă ideală, fără să se ţină seama de particularităţile fiziologice individuale. Este incorect să se considere egale valorile hemoglobinei obţinute la copil sau la omul matur, la femeie sau la bărbat, sau în diferite regiuni, deoarece statistica arată diferenţe semnificative ce pot depăşi 20%, după cum reiese din următoarele cifre:

— bărbat adult normal	16	g Hb% = 100%
— femeie adultă normală	14	g Hb% = 87% (—13%)
— copil nou-născut	19,5	g Hb% = 122% (+22%)
— copil normal la 2 ani	12	g Hb% = 78% (—22%)

O altă cauză de eroare rezultă din coeficientul mare de variaţie care grevează numărătoarea eritrocitelor (eventual şi determinarea hemoglobinei dacă se face cu aparatul Sahli).

În afara acestor neajunsuri, V.G. nu permite aprecierea, în toate cazurile a încărcării cu hemoglobină; de exemplu nu poate diferenţia eritrocitele cu volum normal şi cu încărcare normală cu hemoglobină (anemii normocitare normocrome) faţă de cele voluminoase, dar cu încărcare slabă cu hemoglobină (macrocitoză cu hipocromie).

Din aceste motive, majoritatea autorilor recomandă renunţarea la acest indice, propunînd înlocuirea lui cu constantele eritrocitare de bază: volumul eritrocitar mediu (VEM), hemoglobina eritrocitară medie (HEM) şi mai ales concentraţia medie de hemoglobină pe eritrocit (CHEM).

În afara acestor indici principali, există un număr de indici mai puţin utilizaţi, ca indicele de volum (I V), indicele de saturaţie (I Sat.), indicele de sfericitate (I S) etc. care mai păstrează o oarecare utilizare însă numai în cercetarea ştiinţifică.

Scanned with OKEN Scanner

d. **Metode automatizate de determinare a constantelor eritrocitare**

Termenul de „hemogramă automatizată" este utilizat pentru a desemna utilizarea unor procedee moderne, introduse în ultimii ani (126). Pentru numărarea elementelor figurate sanguine s-au introdus procedee electronice cu ajutorul cărora se poate face o numărare diferită a celulelor, după caracteristicile fizice ale acestora.

Prin introducerea automatizării în medicină se economisește timp, se pot face determinări de mare precizie (se elimină factorul subiectiv în aprecierea nuanțelor, factorul oboseală și alte surse de erori).

Pentru *numărătoarea eritrocitelor*, în țara noastră se folosește, în unele laboratoare, aparatul de numărat numit *Celoscop*. Principiul de funcționare a aparatului se bazează pe înregistrarea modificărilor rezistenței electrice a soluției de sînge, prin interpunerea particulelor (celulelor), care sînt înregistrate individual în cursul trecerii lor printr-un orificiu foarte mic (229, 349).

Sîngele de cercetat este pus într-un recipient ce conține un anumit solvent. În acest recipient se introduce altul (de mărime mai mică) umplut cu același solvent, care comunică cu primul printr-un orificiu foarte fin. În fiecare recipient există cîte un electrod; între aceștia se stabilește un circuit electric. Lichidul din recipientul mare este aspirat în recipientul mic printr-un sistem de pompă de vid. Eritrocitele nefiind bune conducătoare de electricitate, în momentul în care trec prin orificiu fac să crească rezistența electrică a circuitului, cu scăderea voltajului între cei doi electrozi, ceea ce declanșează un semnal electric, care este amplificat de un contor și înregistrat automat. O numărătoare de eritrocite cu această metodă durează între 30 și 60 de secunde.

Dintre multiplele procedee propuse pentru determinarea hemoglobinei metoda acceptată astăzi este determinarea fotometrică sau spectrofotometrică a hemoglobinei, transformată în cian-methemoglobină (vezi pag. 136); aparatele cu citire automată (electronică) tind să înlocuiască complet vechile fotometre cu citire vizuală (există astfel de aparate adaptate exclusiv pentru dozarea hemoglobinei).

Pentru determinarea hematocritului, una dintre îmbunătățirile care au putut fi aduse metodei clasice, constă în elaborarea unor microtehnici. Microhematocritul constă în folosirea de tuburi de sticlă de calibru capilar, heparinate. Platoul de centrifugare primește 24 astfel de microtuburi. Citirea se face direct pe o abacă curbă așezată pe planul de bază.

Determinările sanguine „în bandă" (automatizată sau semiautomatizată) cunosc o răspîndire și o dezvoltare continuă, mai ales în cazurile în care se fac studii statistice pe un număr mare de indivizi. Hematologia este unul din beneficiarii principali ai acestor sisteme. Spre deosebire de determinările individuale, unele fabrici de aparate electronice medicale au realizat adevărate benzi tehnologice de transfer în care gruparea, diluarea, numărarea, colorimetria, calcularea și editarea rezultatelor se face automat. *Sistemul SMA 7 A* (fabricat de firma Technicon) este un aparat cu flux continuu care, printr-o pompă, distribuie cantități precise de probe de sînge într-un set de tuburi din care se fac determinările automat, iar rezultatele se înregistrează grafic (tot automat) pe o hîrtie gradată. *Sistemul Coulter S* (fabricat de firma Coultronics) funcționează

Scanned with OKEN Scanner

printr-un sistem pneumatic care asigură transferul probelor de la un sistem electronic la altul unde se efectuează calcularea și înregistrarea rezultatelor (126).

Aceste tehnici complexe au și ele dezavantajele lor putînd introduce unele surse de eroare. Una din ele este dificultatea de etalonare cu persistența unei erori sistematice (cu diferențe de la un laborator la altul); aceste erori sînt foarte greu de eliminat și necesită reetalonări frecvente, greu de efectuat.

3. ALTE PROCEDEE INDIRECTE DE EXPLORARE A ERITROPOIEZEI

a. **Explorarea radiologică a scheletului** în hemopatii este o metodă de rutină. Rolul examenului radiologic este uneori capital: diagnosticul poate fi pus adeseori direct pe baza radiografiilor. În osteozele condensante determinate genetic (osteopetroză și altele) examenul radiologic

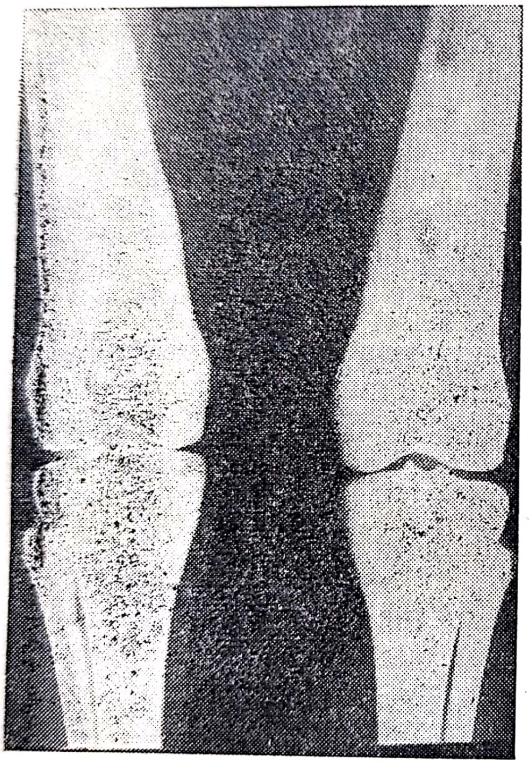


Fig. 2-33. Radiografie osoasă a regiunii genunchilor la bolnava R. S. de 22 ani; diagnostic — osteopetroză (obs. A. Vîlcu, 1972).
Condensarea masivă a spongioasei epifizare și extinderea compactei epifizare asupra medularei.

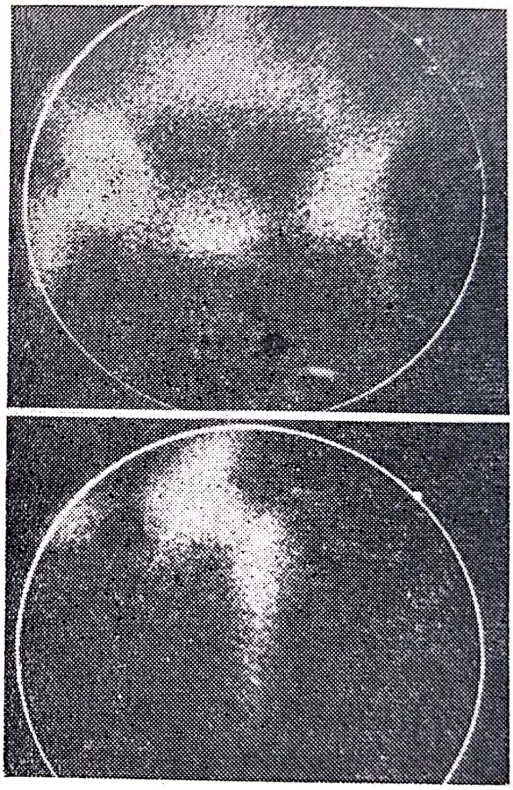


Fig. 2-34. Scintigramă medulară efectuată cu ajutorul 99 mTc coloidal la un bolnav cu boală Vaquez (după J. D. Pain, C. Fresch și Y. Najean, 1973).
Importantă fixare la nivelul bazinului și a extremităților inferioare ale femurului. *Jos:* extinderea teritoriului medular pînă la 1/3 în afara femurului.

poate fi hotărîtor. În mielom, dezvoltarea tumorilor multiple ale osului (cu aspect de geode) pot apare uneori, în absența unei infiltrații medulare difuze. În anemiile hemolitice ereditare (hemoglobinoze, enzimopatii,

Scanned with OKEN Scanner

microsferocitoza) examenul radiologic poate pune în evidență variate modificări osoase (fig. 2-33).

b. **Metode izotopice de explorare a eritropoiezei**

Scintigrafia măduvei osoase, este o metodă nouă în curs de perfectare care urmărește stabilirea zonelor în care se găsește măduva activă. Tehnica, simplă și netraumatizantă, este o completare necesară în unele cazuri, a celorlalte metode de investigare a producției medulare. Pînă în prezent au fost încercați mai mulți izotopi radioactivi: aur (^{192}Au), tehnețiu (^{199m}Tc), indiu (^{113m}In), fier (^{52}Fe și ^{59}Fe) etc. dar niciunul nu este elementul perfect adaptat sau utilizabil pentru eritropoieză. În prezent, cel mai mult folosit este ^{199m}Tc, dar sînt în curs cercetări cu transferină marcată cu ^{113m}In (fig. 2-34). Există o strînsă corespondență între imaginile obținute prin scintigrafia osoasă și cele obținute prin biopsie.

Imagini concludente s-au obținut în boala Vaquez și anemiile hemolitice (unde există o puternică expansiune a măduvei eritropoietice), în mielofibroză (unde impregnarea este foarte concentrată în splină, cu scăderea activității medulare), în insuficiențele medulare (provocate de diferite mecanisme) etc. În insuficiența medulară globală apare o netă diminuare de fixare la nivelul zonelor active în mod normal. În eritroblastopenia cronică tip Blackfan-Diamond, în care scintigrafia măduvei pentru seriile albe este normală, scintigrafia măduvei eritropoietice, efectuată cu ^{52}Fe, arată o hipoplazie importantă (177, 260, 261).

Alte metode izotopice de explorare a măduvei osoase ca ferokinetica, autoradiografia, durata de viață a eritrocitelor sînt prezentate la capitolele respective (vezi și indexul alfabetic).

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 3

MORFOLOGIA ŞI STRUCTURA ERITROCITULUI CIRCULANT

I. MEDIUL CIRCULANT AL ERITROCITULUI

A. PROPRIETĂŢILE GENERALE ALE SÎNGELUI

Sîngele este un ţesut format din elemente celulare suspendate în plasmă. El nu este un lichid izolat care circulă într-un sistem închis de conducte de diferite calibre, ci reprezintă o parte din mediul intern care hrăneşte toate celulele organismului. Pe baza schimburilor permanente dintre sînge şi celule, prin intermediul lichidului interstiţial, se desfăşoară toate procesele fundamentale ale vieţii: respiraţia, nutriţia, excreţia şi altele.

Elementele figurate ale sîngelui circulant reprezintă o parte a ţesutului sanguin: componenta „finită" care îndeplineşte numeroase procese fundamentale necesare vieţii. Cu toată dispersia sa, sîngele este un organ unitar şi funcţiile sale decurg tocmai din această răspîndire în tot organismul. Prin contactul reciproc între sînge şi toate celulele din corp, el devine, alături de sistemul nervos, un coordonator al unităţii organismului, avînd rolul principal în asigurarea homeostaziilor. Spre deosebire de rolul sistemului nervos, acţiunea coordonatoare a sîngelui este materializată prin transportul anumitor produşi biologici rezultaţi de pe urma proceselor metabolice şi care pot fi puşi relativ uşor în evidenţă (10, 33, 142).

1. VOLUMUL SANGUIN

Volumul sanguin (volemia) reprezintă cantitatea de sînge circulant şi de depozit al unui organism. Volemia este o constantă; ea variază în limite strînse în funcţie de anumiţi parametri fiziologici (sex, vîrstă, greutate, înălţime etc.). În cazuri patologice volumul sanguin poate

Scanned with OKEN Scanner

prezenta variaţii mai mari (de exemplu, în anemia posthemoragică acută) sau creşteri (de exemplu, în policitemii).

a. **Volemia fiziologică** reprezintă aproximativ a 13-a parte din greutatea corporală a unui bărbat adult şi a 14-a parte din greutate la femei, fiind deci mai scăzută cu 5—10% faţă de aceea a bărbatului. Exprimată

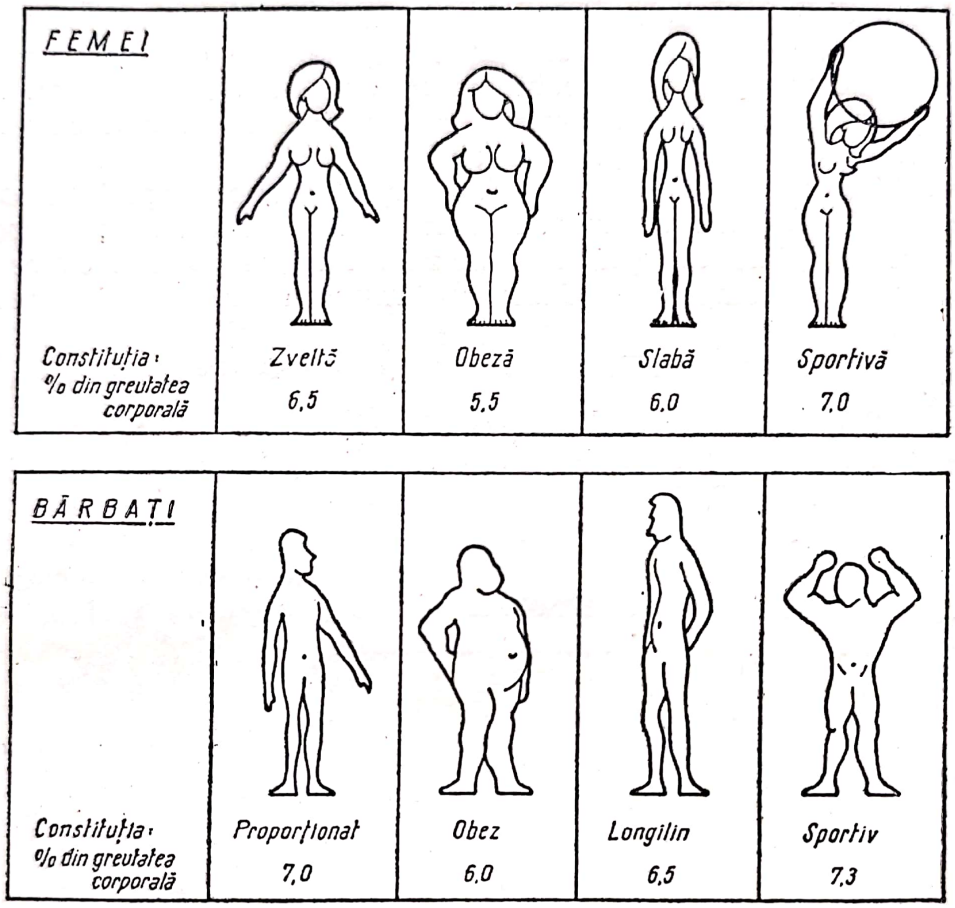


Fig. 3-1. Volemia normală la cele două sexe după tipul constituţional şi după ritmul de activitate fizică (după V. F. Bruber şi M. Allgöwer, 1968).

(Cifra trecută sub fiecare figură reprezintă ml sînge la 100 g greutate corporală).

în procente, volemia reprezintă 7,5—8% din greutatea corporală la bărbat şi 6,8—7,3% la femeie; exprimată în ml la kg greutate corporală, este de 60—80 ml/kg. Raportat la suprafaţa corporală, sîngele este în cantitate medie de 3 l/m² la bărbat şi 2,5 l/m² la femeie.

Vîrsta are un rol important în volemie; copilul deţine o cantitate de sînge dublă în raport cu greutatea corporală, faţă de omul bătrîn, la care activităţile metabolice sînt mai reduse. Persoanele care îndeplinesc munci fizice sau fac sport au un procent mai ridicat de sînge decît cele care duc o viaţă sedentară. La obezi proporţia de sînge este mai scăzută decît la persoanele slabe (fig. 3-1). Graviditatea face să crească volumul sanguin, paralel cu vîrsta sarcinii, realizînd un excedent pînă

Scanned with OKEN Scanner

la 20—25% din volumul inițial. Această creștere interesează mai ales plasma sanguină, diluția masei eritrocitare care rezultă putînd duce la greșala diagnosticării unei anemii inexistente. Concomitent cu volemia crește, într-o proporție însemnată, lichidul interstițial cu circa 3 litri.

b. **Volumul sîngelui circulant și de rezervă.** Cînd organismul se află în stare de repaus, aproape jumătate din masa totală a sîngelui (45%), se mișcă atît de încet, încît a fost considerată în afara circulației; în realitate ea este doar în afara circulației rapide. Sîngele, care stagnează în organele de rezervă, este mobilizat în circulația activă după necesitățile organismului. Cele mai importante organe de depozit sînt ficatul, splina și plexul venos subpapilar al pielii.

Ficatul, prin structura lacunară a venelor suprahepatice, poate să depoziteze 500—800 ml de sînge. Așezarea lui înainte de revărsarea sîngelui venos în inima dreaptă, îi conferă un rol important ca organ de depozit. Evacuarea sîngelui se face sub influența adrenalinei, care deter-

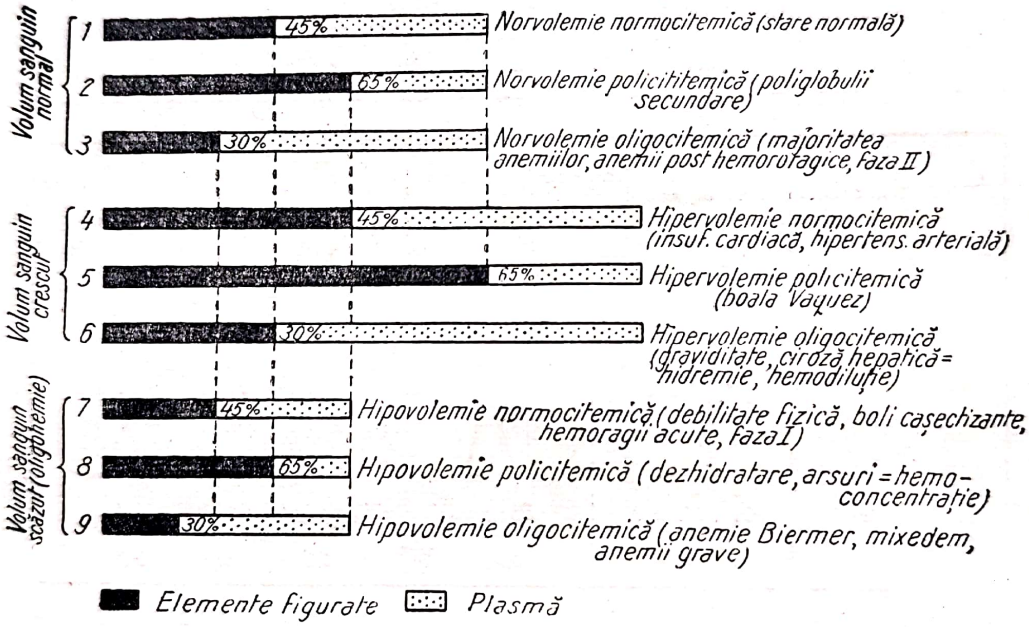


Fig. 3-2. Reprezentare schematică a celor 9 variante ale volumului sanguin, cu raporturile dintre plasmă și masa eritrocitară (modificat după Rowntree).

Volumul sanguin normal (norvolemie), crescut (hipervolemie) și scăzut (hipovolemie) pot fi, la rîndul lor, însoțite de un hematocrit normal (normocitemie), crescut (policitemie) și scăzut (oligocitemie). Pe baza combinării acestor elemente se deosebesc 9 tipuri de modificări ale volumului sanguin. O interpretare superficială a rezultatelor poate duce la confuzii urmate de greșeli terapeutice. Astfel, în cazurile 4 și 7, determinarea procentuală a masei eritrocitare dă rezultate normale, diferențierea fiind posibilă prin determinarea volumului sanguin total. Cazul 6 simulează o anemie inexistentă, deși nu există decît o deshidratare a sîngelui.

mină contracția venelor suprahepatice. *Splina* la om, spre deosebire de unele animale alergătoare, are în economia generală a circulației o importanță mai mică în calitate de rezervor sanguin. Mai important este volumul ei în reglarea regimului circulator portal (evident în sindroamele de hipertensiune portală). În unele situații patologice cu splenomegalii

Scanned with OKEN Scanner

importante, splina poate sustrage din circulaţia activă o cantitate importantă de sînge sau poate încărca circulaţia portală. Sîngele lienal (venos) se caracterizează printr-o concentraţie crescută a masei celulare. *Plexul venos subpapilar* al pielii poate să adăpostească 500—1 200 ml sînge. Sîngele stagnează în cantitate mai mică sau mai mare în muşchi, sinusurile venoase medulare, intestin, plămîn etc.

Sîngele din circulaţia arterială reprezintă sub 15%, cel din capilarele propriu-zise între 1 şi 2%, iar sîngele venos circa 85%.

Clasificarea veche a variaţiilor volemiei, propusă de Rowntree, este adoptată de majoritatea manualelor de fiziologie sau hematologie. Acest autor distinge trei situaţii: volum sanguin *normal* (norvolemie), *scăzut* (hipovolemie) sau *crescut* (hipervolemie), grupînd, în cadrul fiecăreia, alte trei modalităţi de realizare a lor folosind ca criteriu valorile hematocritului (fig. 3-2).

2. CONSTANTELE FIZICE ALE SÎNGELUI

Proprietăţile fizice, chimice şi morfologice ale sîngelui sînt menţinute în mod normal în anumite limite stabile (10, 33, 103).

a. **Densitatea sîngelui** total este de 1055—1065 g/l (în medie 1060); mai scăzută la femeie decît la bărbat. Ea rezultă din densitatea elementelor figurate (1090—1100) şi din densitatea plasmei (1025—1030). Densitatea plasmei şi variaţiile ei sînt dependente, în primul rînd, de concentraţia proteinelor plasmatice; plasma deproteinizată are o densitate de 1006.

În condiţii fiziologice densitatea sanguină poate scădea sau creşte tranzitor, în funcţie de ingestia sau pierderea de lichide. Patologic, densitatea sîngelui poate prezenta variaţii în funcţie de concentraţia elementelor care o determină; poate scădea în hipoproteinemii (inaniţie, ciroze, nefroze etc.) sau în anemii. Creşteri se întîlnesc în poliglobulii, hiperproteinemii (mielom), dar mai ales în caz de hemoconcentraţie (transpiraţii profuze, diarei, vărsături).

b. **Vîscozitatea sîngelui** este forţa ce ia naştere din frecarea păturilor de lichid în curgerea laminară sau cu alte cuvinte, presiunea tangenţială exercitată de sînge pe suprafaţa de alunecare. Cu cît vîscozitatea este mai mare, cu atît este necesară, din partea inimii, o presiune mai mare pentru propulsia sîngelui. Vîscozitatea este în funcţie de concentraţia proteinelor şi a elementelor figurate sanguine, care măresc forţa de frecare internă în cursul circulaţiei sîngelui. Etalonul de comparaţie este apa distilată care are vîscozitatea convenţională de 1. Vîscozitatea sîngelui total este de 4—5 ori mai mare decît a apei. Ea este crescută de 2—3 ori în poliglobulii (putînd ajunge pînă la valori de 10—15 unităţi apă) şi scăzută în anemii. Emisia de sînge scade într-o mare măsură vîscozitatea sîngelui şi prin aceasta uşurează munca miocardului.

c. **Presiunea osmotică, coloid-osmotică (oncotică) şi hidrostatică**

Presiunea osmotică este presiunea ce ia naştere între o soluţie şi solventul acesteia de care este despărţită printr-o membrană semipermeabilă. Presiunea osmotică a sîngelui, măsurată cu osmometrul, este egală cu 6,7 atmosfere sau 5 300 mmHg. Ea este, practic, aceeaşi în sînge, în

Scanned with OKEN Scanner

lichidul interstițial și în interiorul celulelor. Valoarea constantă a presiunii osmotice este unul din factorii de bază ai homeostaziei organismului. În menținerea presiunii osmotice a sîngelui un rol important îl are rinichiul, care elimină excesul de apă sau de săruri, după cum este cazul. Presiunea osmotică se determină astăzi direct sau prin intermediul *punctului de congelare* sau *crioscopic*. Presiunea osmotică a unui lichid depinde exclusiv de numărul de particule din soluție (molecule și ioni) indiferent de mărimea acestora. Ea este determinată, într-o proporție de peste 50%, de sare. Eritrocitele și proteinele, din cauza numărului redus de particule, au un rol minim, de aceea punctul crioscopic al sîngelui total este practic același cu al plasmei.

Presiunea oncotică sau coloid-osmotică, aducînd presiunea exercitată de substanțele macromoleculare prin intermediul electroliților, reprezintă una din forțele ce stau la baza proceselor fiziologice (schimburi de substanțe dintre celule și sînge, reglarea volumului sanguin, excreția urinii etc.). Presiunea coloid-osmotică a plasmei este de 25 mmHg iar a lichidului interstițial — de circa 15 mmHg. Diferența dintre ele se datorește nivelului diferit al concentrației de proteine a celor două sectoare (6—8 g% în plasma sanguină și 0,3—0,6% în lichidul interstițial) și determină un „curent" de apă și electroliți din spațiul interstițial, către cel intravascular.

Presiunea hidrostatică rezultă din forța de propulsie a inimii, viteza de circulație și diametrul capilarelor; ea acționează în sens opus presiunii coloidosmotice. Presiunea sîngelui în sistemul capilar reprezintă aproximativ 1/3 din presiunea arborelui arterial — (40 mmHg, față de 120 mmHg la nivelul plicii cotului) — scăzînd apoi la 10—15 mmHg în extremitatea venoasă a capilarului (fig. 3-3). Diametrul redus al capilarelor imprimă eritrocitului o frecare crescută, ceea ce favorizează, în plus, schimburile de substanțe dintre cele două sectoare lichide.

d. **Reacția sîngelui** (concentrația ionilor de H^+, pH-ul) este menținută constantă, indiferent de cantitatea de grupări acide sau bazice introduse prin produșii de catabolism formați în țesuturi sau prin alimentele ingerate; ea este situată la un pH de 7,35.

Proprietatea de a menține constant numărul de H-ioni este numită *izohidrie*; ea reprezintă un aspect al *izoionieі* generale (constanța compoziției în electroliți a sîngelui). Izohidria și izoionia, împreună cu *izotonia* (constanța presiunii osmotice) formează *izostructura sîngelui*, condiție necesară pentru funcționarea normală a organelor și țesuturilor.

Față de influxul continuu de substanțe acide sau bazice, rezultate din activitățile metabolice sau din alimentație, pH-ul sanguin se menține constant datorită neutralizării excesului de valențe acide sau bazice de către sistemele tampon. Un *sistem tampon* constă dintr-un amestec de acid slab (de exemplu CO_3H_2) și sarea acestuia cu o bază tare (în cazul dat CO_3HNa).

„Ajustarea" unui sistem tampon pentru un anumit pH se face prin-

Scanned with OKEN Scanner

tr-un anumit raport între cei doi termeni ai sistemului; în cazul sistemului: $\frac{CO_3H_2}{CO_3HNa}$
raportul în condițiile pH-ului sanguin este de 1/20. În organism există și alte sisteme tampon, atît în plasmă cît și în eritrocite, cel mai important fiind sistemul acid carbonic/bicarbonat.

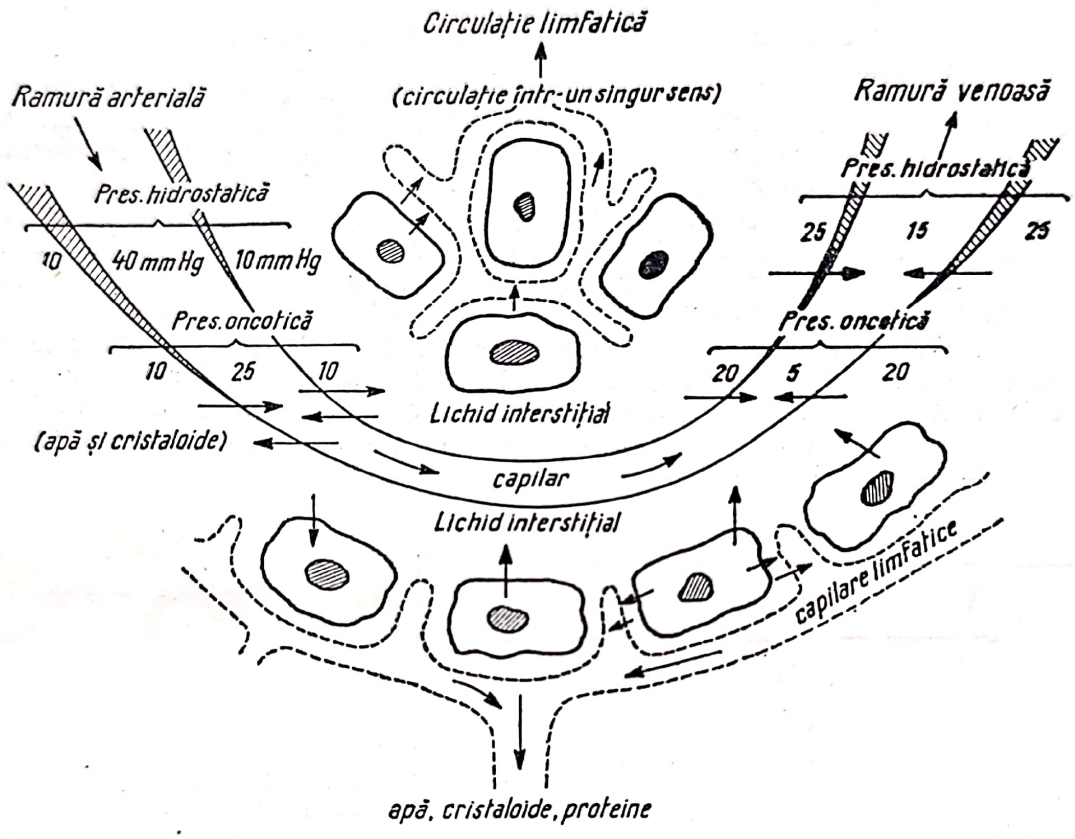


Fig. 3-3. Reprezentare schematică a schimburilor nutritive, a gazelor și a apei la nivel capilar.

Atît în zona arterială a capilarului, cît și în zona venoasă, există cîte 2 valori de presiune: hidrostatică, provenită din forța de propulsie a inimii și coloid-osmotică (oncotică) dependentă, în special de concentrația macromoleculelor. La extremitatea arterială a capilarului predomină presiunea hidrostatică, care împinge lichidul — ce conține substanțe nutritive — în spațiul interstițial, iar la extremitatea venoasă, predomină presiunea oncotică care aspiră, din spațiul interstițial, lichidul ce conține produși de catabolism; acestea, pe baza presiunii hidrostatice restante, sînt dirijate spre organele de depurare: rinichi, plămîni, ficat, piele etc., rezultînd presiunea eficientă de filtrare.

CO_2 nu poate fi considerat numai ca „un deșeu" ce trebuie eliminat cu orice preț; el este un produs de catabolism ce îndeplinește o funcție vitală, pînă în momentul în care părăsește organismul. Rezerva alcalină a sîngelui (=cantitatea de alcalii fixați sub formă de bicarbonat în plasmă) se situează în mod normal între 50 și 60 vol. % CO_2 sau 22—28 mEq/l (în medie 25 mEq/l). Ea se determină volumetric prin metoda van Slyke. Acidoza și alcaloza sînt stări în care echilibrul acido-bazic al organismului este deviat în sensul acidității sau alcalinității.

3. PLASMA SANGUINĂ

Plasma sanguină este partea lichidă a sîngelui obţinută după tratarea lui cu substanţe anticoagulante şi sedimentarea elementelor figurate. O prezentare succintă a compoziţiei plasmei sanguine în acest cadru este şi ea inevitabilă din cauza corelaţiilor intime ale acesteia cu eritrocitele (231).

Proprietăţi şi structură. Plasma este alcătuită, în proporţie de 90% din apă şi 10% din substanţe solide. Din acestea, 9 g% sînt substanţe organice, iar 1 g% substanţe anorganice. Substanţele organice sînt azotate şi neazotate; din cele azotate majoritatea sînt substanţe proteice (circa 8 g%) şi o mică parte sînt substanţe neproteice (35 mg%). Substanţele neazotate (1 g%) sînt reprezentate prin glucide, lipide şi diferiţi produşi metabolici.

În plasma sanguină se găseşte un amestec complex de proteine ce se deosebesc, atît prin structura, cît şi prin funcţia lor; numărul lor este de 100—150 şi poate şi mai mare. Unele tipuri de proteine plasmatice se află în cantitate relativ mare, pe cînd altele se găsesc în cantităţi infime.

O parte din proteinele plasmatice au putut fi purificate, definindu-se atît structura lor fizico-chimică, cît şi funcţia lor, pe cînd altora li s-au putut stabili doar unii parametri fizici (mobilitatea electroforetică, constanta de sedimentare, coeficientul de difuziune etc.) sau chimici (conţinutul în glucide, compoziţia globală în acizi aminaţi etc.) (fig. 3-4).

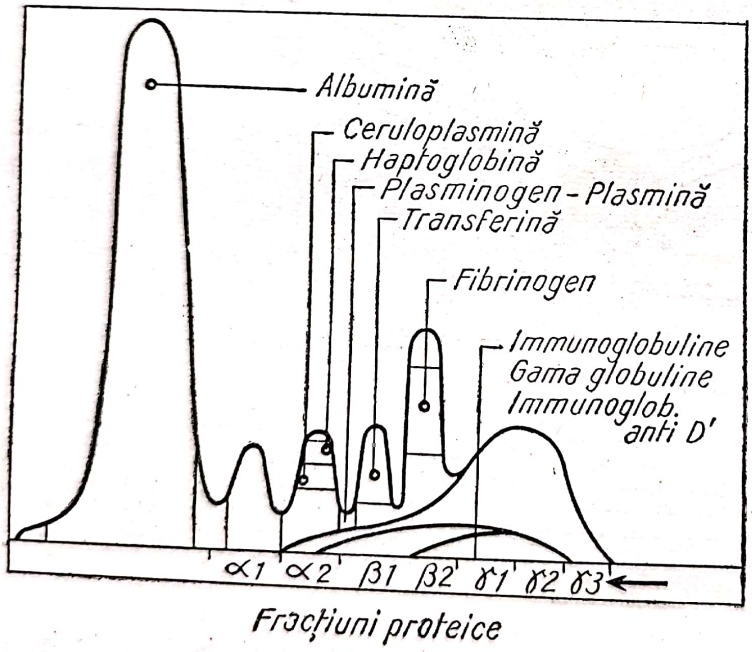


Fig. 3-4. Proteine plasmatice sub forma curbei fracţiunilor electroforetice.

Aceste curbe sînt foarte heterogene; fiecare vîrf al diagramei conţine un număr mare de subfracţiuni proteice.

Plasma sanguină a unui adult conţine 180—200 g de proteine, care însumează o suprafaţă de aproximativ 140 000 m². Rolul proteinelor este multiplu, astfel:

— albumina contribuie la *reglarea echilibrului hidric* (rol în presiunea coloid-osmotică şi deci în volemie); 1 g albumină fixează 20 ml apă;

— alte proteine au rol în *transport:* transferina pentru fier, hepatoglobina pentru hemoglobina liberă, altele leagă temporar substanţe minerale (Ca, Mg, Fe, Cu), lipide, vitamine, hormoni etc.;

— unele proteine îndeplinesc funcţia de catalizatori (de exemplu unele enzime);

— alte proteine au rol imunologic (anticorpi);

— majoritatea factorilor de coagulare sînt proteine plasmatice.

Concentraţia unor proteine serice prezintă, în numeroase boli, abateri de la valorile normale. Modificarea cantitativă izolată a uneia sau mai multor părţi proteice, cu alterarea raportului dintre acestea este numită disproteinemie. Variaţiile patologice ale spectrului proteic, în afară de unele excepţii, dau mai mult un indiciu de tulburare a metabolismului, fără să fie specifice pentru anumită boală. Principalele „constelaţii" proteice patologice sînt următoarele: reacţia inflamatoare (faza acută), hipoproteinemiile sindromul nefrotic, reacţia imunitară (inflamaţii cronice) şi paraproteinemiile (mielom, boală Waldenström) (tabelul 3-1).

Tabelul 3-1

Tabel recapitulativ al principalelor tipuri patologice ale spectrului proteinelor serice. (După J. F. Heremans, 1965)

Constelaţia proteică	Albumine	Globuline			
		α 1	α 2	β	γ
Electroforeza normală (%)	(60 (±4)	3,5 (±1)	6,5 (±2)	10,5 (±2)	18,5 (±4)
Reacţii inflamatorii	—	↗ ↗	↗ ↗	—	—
Hipoproteinemii (cu excepţia cirozei şi a sindromului nefrotic)	↘ ↘	↘	↘	↘	—
Sindrom nefrotic	↘ ↘	—	↗ ↗	↗ (lipo)	—
Reacţii imunitare Hepatită Ciroză	↘ ↘ ↘ ↘	— ↘ ↘	— ↘ ↘	— ↘ ↘ fuziune beta+gama	↗ ↗ ↗ ↗ ↗
Paraproteinemii Mielom IgG Mielom IgA Macroglobulinemie IgM	↘ ↘↘ ↘	— — —	— — —	Paraproteină Paraproteină Paraproteină	

Proteine totale=6—8 g la 100 ml ser sanguin.

Scanned with OKEN Scanner

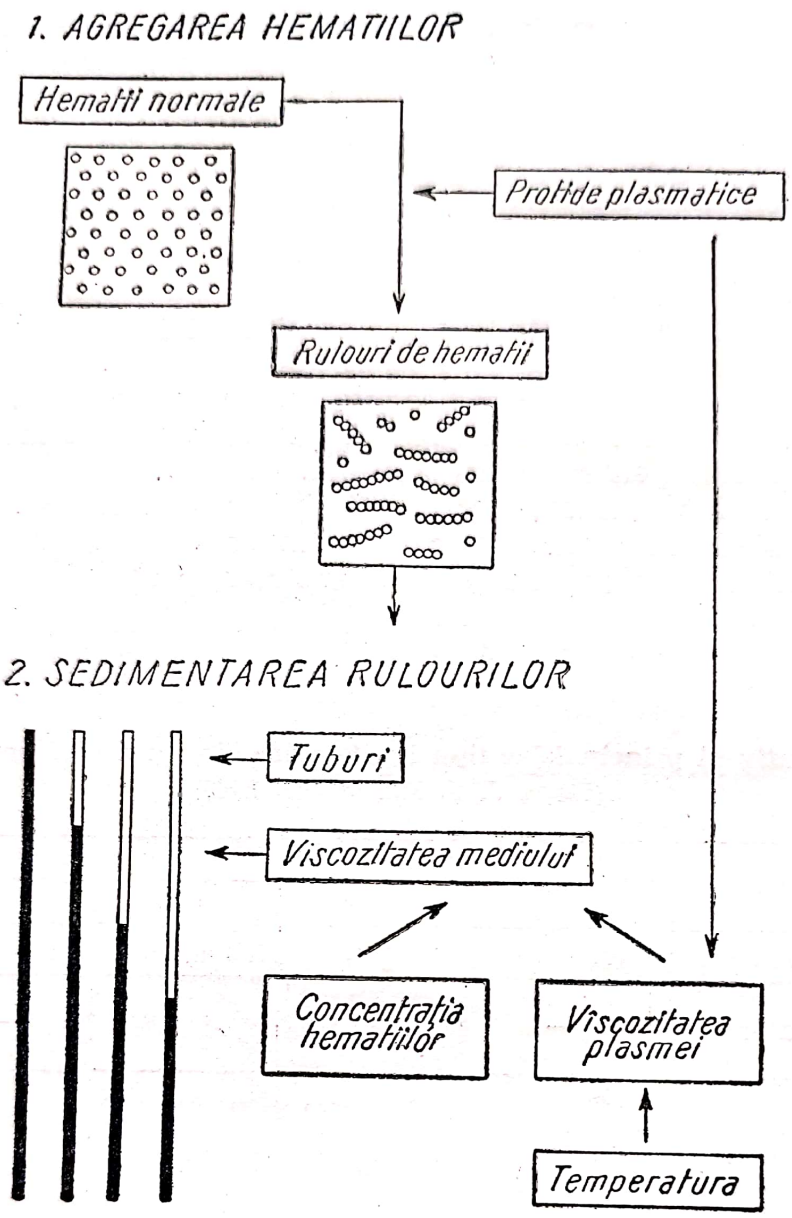


Fig. 3-5. Mecanismul sedimentării (după M. Bourel și colab., 1967). VSH depinde de caracteristicile tuburilor și de vîscozitatea mediului: aceasta, la rîndul ei, este în funcție de cantitatea și calitatea eritrocitelor și a proteinelor plasmatice.

Factorii eritrocitari ai VSH. Dacă eritrocitele sînt normale, VSH este în funcție numai de concentrația eritrocitelor. Cu cît o anemie este mai severă, cu atît sedimentarea eritrocitelor este mai rapidă și cu cît o poliglobulie este mai pronunțată cu atît VSH este mai scăzută. Cînd eritrocitele sînt anormale (anemii hemolitice prin factori intrinseci), se accentuează sedimentarea eritrocitelor.

Factorii plasmatici sînt legați de modificările cantitative și calitative ale proteinelor plasmatice. La persoanele cu eritrocite normale, dar cu VSH crescută, se pare că există și factori plasmatici care induc aglomerarea eritrocitară prin reacții de suprafață („aglomerine"); ele ar proveni din dezintegrarea celulelor sau a corpilor bacterieni. Eritrocitele unei persoane sănătoase, suspendate în plasma unui bolnav cu VSH crescută, se sedimentează cu aceeași viteză ca și eritrocitele bolnavului. Creșterea, mai ales a fibrinogenului (care este cea mai aglomerantă proteină plasmatică), apoi a fracțiunilor α_2 și γ_2 globulinelor, favorizează sedimentarea eritrocitelor, pe cînd albumina (care are o moleculă relativ mică) nu influențează asupra sedimentării.

Viteza de sedimentare a eritrocitelor (VSE sau VSH). Sîngele reprezintă o suspensie de eritrocite în plasmă; la rîndul ei plasma este o suspensie de macromolecule proteice, agregate plurimoleculare (de exemplu chilomicroni etc.). Sîngele extravazat, tratat cu o substanţă anticoagulantă, pus într-un tub de sticlă şi lăsat în repaus, permite elementelor figurate să se depună pe fundul recipientului. Stabilitatea relativă sau instabilitatea suspensiei eritrocitelor în plasmă depind de factori eritrocitari şi de factori extraeritrocitari (48).

Mecanismul sedimentării comportă două procese: unul biologic, în care se realizează *agregarea eritrocitelor*, şi altul fizic de *sedimentare a rulourilor formate* (fig. 3-5).

În prima fază eritrocitele se dispun în agregate sub formă de fişicuri vizibile la microscop. Aceste rulouri au, în condiţii normale sau în diferite stări patologice, o anumită viteză de formare şi un volum variabil. Agregarea este reversibilă, putîndu-se desface prin agitare; ea depinde de factori eritrocitari şi extraeritrocitari; există un raport între viteza de formare, dimensiunea rulourilor şi sedimentarea acestora.

Deşi determinarea VSH este cea mai răspîndită şi cea mai simplă analiză de laborator, pe baza căreia se fac deseori aprecieri asupra stării de sănătate a subiecţilor, există încă numeroşi factori necunoscuţi care influenţează sedimentarea.

B. CIRCULAŢIA TERMINALĂ

Schimburile nutritive dintre celule şi sînge se desfăşoară la nivelul capilarelor prin intermediul lichidului interstiţial; la acest nivel, sensului „longitudinal" al curentului circulator i se adaugă un sens „transversal". Primul este reprezentat de parcursul inimă — artere — capilare — vene (cu circulaţie în „sens unic"), iar ultimul de schimburile (în dublu sens) de apă, săruri, elemente nutritive, căldură etc., între sînge şi ţesuturi, pe baza presiunii hidrostatice şi coloid-osmotice. În felul acesta, la nivelul capilarelor se realizează scopul propriu-zis al circulaţiei, puntea de legătură dintre circulaţie şi metabolism, toate celelalte sectoare ale circulaţiei servind ca auxiliare ale funcţiilor capilare (33, 41, 125, 197, 275).

În cadrul circulaţiei terminale distingem un sistem capilar sanguin, în care mediul de dispersie este plasma şi un sistem lacunar, în care mediul de dispersie este lichidul interstiţial.

1. SISTEMUL CAPILAR ŞI LACUNAR

a. **Sistemul capilar sanguin.** Arterele se ramifică în ţesuturi din ce în ce mai mult, continuîndu-se cu o imensă reţea de capilare, vase foarte fine, cu o structură specială, care ajung în contact cu cele aproximativ 100 000 de miliarde de celule ale organismului. Între arteriolele, bogat muscularizate şi capilarele fără musculatură, există metaarteriolele care mai păstrează, într-un anumit grad, învelişul muscular sub formă de sfinctere (sfincter precapilar) care, în funcţie de starea de contracţie sau

Scanned with OKEN Scanner

relaxare, permite angajarea sîngelui în capilare. Între arteriole și venule sîngele nu trece obligator prin capilare, ci poate să scurtcircuiteze acest sistem prin anastomozele arteriovenoase (șunturi), care au rolul de a doza presiunea și debitul sanguin din capilare. Ele sînt prevăzute, de asemenea, cu un strat muscular (15, 84, 132, 177, 275, 339) (fig. 3-6).

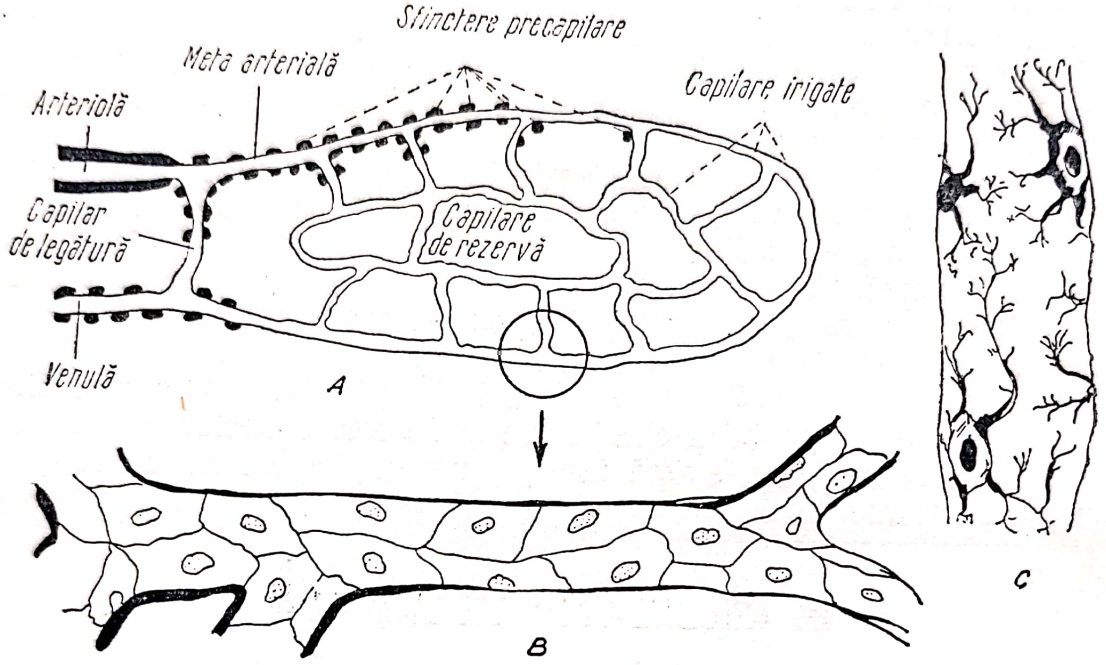


Fig. 3-6. Diferite aspecte ale capilarelor sanguine.

A. Schema circulației capilare (după Zweifach și Schroeder). Circulația capilară este formată dintr-un sistem de rețele canaliculare cu diametrul de 5—10 μ. În stare de dilatație, diametrul capilarelor poate ajunge pînă la 15 μ, iar cînd circulația este închisă, diametrul lor poate dispare complet.

B. Secțiune prin peretele capilar (impregnație cu nitrat de argint) (după Best și T. Taylor, 1958). Capilarele sînt alcătuite dintr-o membrană bazală subțire, formată dintr-un strat de celule endoteliale, anastomozate între ele, dotate cu proprietăți fagocitare.

C. Pericitele (celulele adventiționale) ale unui capilar sanguin (după I. Diculescu și colab., 1971). În jurul endoteliului capilar se dispun discontinuu celule (periteliu). Un rol important al acestui periteliu îl au *pericitele* (celulele adventiționale sau celulele Rauget), răspîndite din loc în loc pe toate capilarele. Ele au o formă stelată și sînt așezate perpendicular pe celulele endoteliale pe care le înfășoară ca niște manșoane. Rolul lor este de a se contracta, asigurînd o oarecare independență a capilaro-motricității, față de factorii centrali.

Ramificarea totală a capilarelor este foarte mare, peste 6 000 m²; pătrunderea în sistemul capilar a unui cm³ de sînge echivalează cu întinderea lui pe o peliculă cu suprafața de 3 000—7 000 cm². Toate acestea ilustrează contactul foarte intim dintre țesuturi și sînge.

Fiecare țesut dispune de capilare active și capilare de rezervă, care irigă țesuturile după necesități. Gradul de capilarizație a organelor este diferit; proporția de vascularizație este în funcție de intensitatea proceselor metabolice.

În jurul endoteliului capilar se dispun, discontinuu, celule (periteliu) care diferă de la o regiune la alta. Un rol important al acestui periteliu îl au pericitele, celule adeventiționale sau celule Rouget, răspîndite din loc în loc, al căror rol este de a asigura o oarecare independență a capilaro-motricității.

Scanned with OKEN Scanner

b. **Sistemul limfatic.** Spațiile interstițiale drenează, atît în circulația sanguină de întoarcere, cît și în vasele limfatice. Sistemul limfatic este un sistem închis ce începe printr-o rețea capilară care se interpune între celule ca niște funduri de sac ce confluează centripet în afluenți cu calibru din ce în ce mai mare (venule, vene limfatice) terminîndu-se prin două colectoare limfatice mari: canalul toracic și marea venă limfatică.

Pe traiectul venelor limfatice mari se interpun 500—600 de ganglioni limfatici, în care limfa circulă prin sinusuri, după care îi părăsește prin limfaticele eferente. Ganglionii sînt dispuși în anumite „zone strategice" (rădăcinile membrelor, regiunea gîtului, peribronșic, regiunea mezenterică etc.) unde interceptează (filtrează) microbii și unele substanțe macromoleculare, care au trecut barierele naturale ale organismului.

Histologic, pereții capilarelor limfatice sînt formați din celule endoteliale și sînt mult mai permeabili decît cei ai capilarelor sanguine. Ei pot deveni uneori atît de lacși, încît cu greu pot fi considerați elemente de separare între spațiile lichidiene.

Compoziția limfei este asemănătoare cu cea a plasmei sanguine; ea conține însă o proporție mai redusă de proteine (0,5—4 g% față de 6—8 g din plasmă). În limfă se găsește un număr variabil de leucocite (500—20 000); numărul lor este mai redus la periferie și mai ridicat în abdomen și torace, după ce limfa a traversat ganglionii. Dintre leucocite predomină limfocitele; monocitele se găsesc de asemenea într-un procent crescut. Eritrocitele se găsesc în număr redus (100—10 000 pe mm^3) (33).

c. **Lichidul interstițial** reprezintă adevăratul mediu intern al organismului; el mai este denumit și plasmă interstițială sau lichid lacunar. Deși este răspîndit difuz în tot organismul, el ocupă un spațiu închis, delimitat de pereții capilari și membranele celulare. Acesteia i se adaugă lichidele din cavitățile închise ale organismului (pleură, pericard, cavități articulare, teci sinoviale, lichidul din spațiul subarahnoidian etc.) numite lichide transcelulare.

Lichidul interstițial deține rolul capital în nutriția tuturor celulelor din organism, precum și în excreția produșilor de catabolism al acestora. De asemenea, lichidul interstițial reprezintă spațiul de stocare al excedentului de lichid, pentru a se evita, atît încărcarea circulației sanguine, cît și perturbarea metabolismului celular. Orice tendință de creștere a volumului sanguin este însoțită de o trecere a surplusului de lichid, întîi în spațiul interstițial, de unde este preluat treptat de sînge și eliminat prin urină; același lucru este valabil și pentru multe substanțe rezultate prin metabolismul celular. Creșterile patologice de apă interesează în primul rînd lichidul interstițial (edeme) și lichidul transcelular (ascită, hidrotorace).

Compoziția lichidului lacunar este asemănătoare cu a ultrafiltratului sanguin. În timp ce electroliții, substanțele cristaloide (anorganice și organice) și gazele dizolvate sînt în proporții identice, proteinele și lipidele sînt în cantități foarte mici.

Din cei 140 ml de lichid care se filtrează în ambele sensuri între capilare și spațiul interstițial într-un minut, 90% (126 ml) se întoarce la inimă prin circulația venoasă, iar 10% (14 ml), prin circulația limfatică.

În afară de mecanismele care asigură schimburile dintre plasmă și lichidul interstițial (transsudație, resorbție) arătate mai sus, apa și sărurile circulă libere de o parte și de alta a capilarelor prin difuziune liberă (mol la mol) într-o proporție de mai mulți litri pe minut; viteza de „circulație" a lichidului lacunar este dependentă, în principal, de intensitatea proceselor metabolice ale celulelor din zonă.

Scanned with OKEN Scanner

2. CIRCULAȚIA INTRASPLENICĂ (vezi cap. 7, pag. 390)

3. NOȚIUNI DE HEMOREOLOGIE

Urmărirea circulației sîngelui prin sistemul capilar, precum și urmărirea traversării sîngelui — făcut incoagulabil — prin diverse filtre (de hîrtie, porțelan), a dus la un număr mare de cercetări cunoscute sub termenul de hemoreologie (cuv. gr. *rhein*=a curge). Hemoreologia se ocupă de modul în care circulă sau se preling elementele figurate sanguine și componentele plasmatice de diverse dimensiuni în mediul lor natural sau în condiții artificiale, precum și de proprietățile fizice și structurale ale vaselor sanguine cu care vin în contact. Studiile întreprinse în acest scop folosesc atît observații și măsurători directe, cît și diverse modele experimentale. Deși valoarea lor științifică este de necontestat, testele de explorare reologică au intrat pînă în prezent doar sporadic în clinică; cei ce le aplică sînt de părere că aportul lor diagnostic este mare și le prevăd o perspectivă fructuoasă în diagnosticul funcțional. Este incontestabil că scurgerea eritrocitelor prin vase depinde, pe de o parte, de calitatea eritrocitelor (grad de elasticitate, formă), iar pe de altă parte de calitatea pereților rețelei vasculare la nivelul diferitelor organe prin care circulă (rugozități, spasme, atonii etc.).

Tulburări reologice provocate de eritrocite. Eritrocitele circulă, în capilare, în mod normal, grupate, adesea în fișicuri mai mari sau mai mici, în timp ce plasma se scurge în spațiile rămase libere între aceste pachete și peretele vascular. În capilare „tunelul" de scurgere fiind redus, eritrocitele trec numai cîte unul, iar cînd capilarul este mai îngust decît diametrul propriu, ele trebuie să se muleze după spațiul de care dispun; fiind dotate cu o mare plasticitate și elasticitate, ele își revin la diametrul și forma inițială imediat după ce ajung la spațiul larg.

Eritrocitele alterate, fie *in vivo*, sub acțiunea unor factori patologici (diverse anemii hemolitice), fie *in vitro* (tratare cu soluții hipertone, aldehidă formică 5% încălzire la 50° etc.), suferă modificări biochimice în membrană cu modificări de formă, ceea ce duce la pierderea elasticității și plasticității. În aceste condiții traversarea prin capilare este îngreuiată, iar dacă se forțează această trecere, se ajunge la hemoliză.

Întrucît studierea reologiei eritrocitare este dificilă *in vivo*, au fost imaginate numeroase procedee simple de laborator. Una din aceste teste, folosite de Centrul de hematologie din București, este filtrarea eritrocitelor spălate printr-o hîrtie de filtru (a cărei pori sînt de 20—40 μ), procedeu ce poate fi introdus ca o metodă curentă de investigație clinică (307).

Factorii extrinseci, dependenți de mediul în care evoluează eritrocitele, influențează proprietățile lor prin modificările dinamicii circulatorii, ale integrității pereților vasculari și mai ales prin calitățile proteinelor plasmatice de care depinde vîscozitatea sîngelui. Dintre factorii plasmatici, hiperfibrinemia, macroglobulinemia, hipoalbuminemia, pot duce la o

Scanned with OKEN Scanner

încetinire a circulației sanguine. În paraproteinoze, colagenoze, diabet cu complicații degenerative, se realizează o creștere a viscozității serice (48); toți aceștia reprezintă factori potențiali importanți de obstruare a microcirculației. La un hematocrit de peste 60% scurgerea sîngelui prin capilare devine dependentă de capacitatea de deformare a eritrocitelor. După aducerea la normal, *in vitro*, a hematocritului unei policitemii, reologia eritrocitară apare normală, însă dacă la policitemie se adaugă un element care să determine un dismorfism eritrocitar, tulburările în microcirculație nu vor întîrzia să apară.

Factorii intrinseci influențează într-o măsură și mai mare capacitatea de deformare sau de rigiditate a eritrocitelor. Forma biconcavă a eritrocitelor normale oferă un surplus de suprafață celulară pentru un volum dat, element esențial pentru capacitatea hematiilor de a se deforma. Siclemia, anemiile hemolitice cu corpi Heinz, sferocitoza ereditară, acantocitoza și alte stări care alterează fluiditatea internă normală a eritrocitelor, le imprimă un anumit grad de rigiditate, iar forțarea trecerii lor prin capilarele înguste duce la uzura și hemoliza lor precoce. Eritrocitele deformate reprezintă un element important pentru scurtarea duratei de viață a eritrocitelor (177).

Conglomerarea intravasculară a eritrocitelor (fenomenul „blood-sludge“). Cu ajutorul examenului microscopic al capilarelor s-a putut constata, în anumite cazuri patologice, grade variate de conglomerare eritrocitară intravasculară, sugerînd dispoziția în rulouri sau chiar o stare de aglutinare. Acești grunji eritrocitari circulă prin artere cu o viteză, cu atît mai redusă, cu cît sînt mai voluminoși („smîntînire“ a sîngelui); fenomenul a fost numit *blood-sludge* (cuv. engl. *blood*=sînge și *sludge*= =noroi, mîl). În cursul parcurgerii capilarelor, conglomerările se destramă, pentru a se reconstitui în aval de zona capilară.

Acest fenomen reversibil și nespecific de stînjenire a circulației a fost explicat, printre altele, prin adsorbția pe eritrocite a unor globuline, fără să fie anticorpi adevărați, (eritrocite „îmbrăcate“ într-o peliculă anormală ce-i modifică încărcătura electrică). Apariția acestui proces poate fi accentuată atît de rigiditatea și de deformabilitatea eritrocitelor, cît și de smîntînirea plasmei, din unele dis-, sau paraproteinemii, în caz de exces de catecolamine, histamină, bradikinină, trombină, serotonină, alcool etilic, boli generale etc. S-a constatat existența unui paralelism între accentuarea conglomerării și creșterea VSH.

Alte tulburări hemoreologice. Permeabilitatea capilară reprezintă o proprietate fiziologică a circulației terminale prin care apa, sărurile, unele proteine și alte substanțe, traversează peretele vascular în ambele sensuri, permițînd schimburile dintre sînge și mediul intern. Fragilitatea capilară este starea patologică în care pereții capilari permit exodul eritrocitelor în spațiul lacunar.

Concomitent cu permeabilitatea transversală, sîngele trebuie să aibă „cale deschisă“ în sens longitudinal. Fluxul circulației la nivel capilar este adesea tulburat în ambele sensuri; la realizarea acestui fenomen iau parte următorii factori care adesea sînt intricați:

— *factori vasculari* prin mecanism vasomotor (ischemie prin spasme, pareze vasculare, mecanism trofic (avitaminoze), toxiinfecțios etc.;

Scanned with OKEN Scanner

— *factori plasmatici*, prin exagerarea procesului de coagulare intravasculară diseminată cu dezvoltarea peliculei de fibrină care se formează și se lizează permanent la nivelul endoteliului vascular (CID);

— *factori trombocitari*, care se asociază potențînd, atît fragilitatea vasculară, cît și procesul de coagulare intravasculară diseminată.

II. ERITROCITUL NORMAL

Eritrocitele sînt celulele cele mai simple din organism; funcția lor principală este restrînsă la protecția hemoglobinei și la transportul, de către acest pigment respirator, a oxigenului atmosferic la țesuturi.

Denumirea de *eritrocite* a fost contestată; fiind lipsite de nucleu și de organitele necesare pentru sinteza proteinelor, ele nu au fost considerate celule adevărate ci simple vezicule transportoare de hemoglobină. Denumirea de „celule roșii" (cuv. gr. *erytros*=roșu și *cytos*=celulă) a fost dată prin analogie cu leucocitele, „celule albe" (gr. *leukos*=alb). Pentru a sublinia caracterul anucleat, s-a creat denumirea de globule roșii (iar prin analogie, leucocitele au fost numite globule albe), dar nici acest termen nu a satisfăcut, deoarece forma lor nu este sferică, ci turtită și scobită. O altă denumire, tot atît de răspîndită, este aceea de *hematie* (cuv. gr. *haima*=sînge) fără să fie nici ea cu totul corespunzătoare deoarece aceste celule reprezintă o parte din masa sanguină. După criterii morfologice, eritrocitele normale sînt denumite *normocite*. Recent s-a propus pentru eritrocite denumirea de *rubricite*, iar pentru preeritroblești aceea de rubriblești (pentru a nu purta prefixul de „pro" care i-ar situa înaintea altor precursori sanguini de aceeași vîrstă — mieloblești, limfoblești). Deși propunerea este logică denumirea nu a fost însușită de hematologi.

Astăzi, cînd se cunoaște, atît structura, cît și funcțiile acestor elemente sanguine, se acceptă, după caz, toate denumirile enumerate.

Deși lipsite de nucleu și de organite citoplasmatice, aceste elemente sînt totuși celule, dar cu o activitate mai restrînsă; în sprijinul acestei definiri stau următoarele argumente:

— provin din celule complete (preeritroblești) care, pe măsura maturării, și-au simplificat foarte mult structura, adaptîndu-se la funcția de transport a oxigenului;

— eritrocitele unor animale vertebrate sînt nucleate;

— între interiorul eritrocitelor și mediul înconjurător se produc, prin intermediul membranei (care le-a păstrat în cea mai mare parte funcțiile), schimburi foarte active de substanțe;

— eritrocitele păstrează un echipament enzimatic propriu, care le permite supraviețuirea și îndeplinirea funcției de transport a oxigenului în sîngele periferic timp de 120 de zile.

Examenul morfologic al eritrocitelor este un examen de bază în diagnostic, cu condiția ca tehnica să fie efectuată corect, iar rezultatele să fie interpretate cu competență; un frotiu de slabă calitate are o valoare diagnostică limitată, chiar pentru un observator experimentat, putînd duce, uneori, la greșeli regretabile de diagnostic (228, 317). Pentru a obține

Scanned with OKEN Scanner

frotiuri care să aducă contribuții de valoare la diagnostic, este necesar să se respecte următoarele reguli:

— utilizarea unor lame perfect degresate;

— întinderea uniformă a sîngelui în strat subțire, lăsîndu-se cel puțin pe o parte, un spațiu de cîțiva milimetri între pelicula de sînge și marginea lamei;

— uscarea să se facă imediat prin agitare;

— înscrierea obligatorie, cu un creion subțire, într-o zonă periferică limitată (pentru a nu degrada zone prea întinse de pe frotiu și a nu stînjeni citirea) a numelui bolnavului și a datei efectuării frotiului, cu excepția lamelor pregătite pentru cercetarea siderocitelor sau a sideroblaștilor;

— colorare corectă.

La început frotiul va fi examinat cu un obiectiv uscat cu o putere mică de mărire, trecîndu-se apoi treptat la obiectivul cu imersie; în felul acesta examinatorul își face o părere în legătură cu distribuirea și colorația celulelor pe frotiu.

Există în unele laboratoare uzanța ca examinarea frotiului sanguin să se limiteze la efectuarea formulei leucocitare, datele referitoare la eritrocite sau trombocite lăsîndu-se pe plan secundar sau fiind chiar omise, dacă modificările eritrocitare sau trombocitare nu sînt foarte evidente; în alte cazuri, în care se constată existența unor modificări morfologice, apar formulări stereotipice ca: „relativă anizopoikilocitoză și anizocromie" etc., care sînt formale și nu aduc o contribuție reală la diagnostic.

Pentru examinarea morfologiei eritrocitelor, citirea frotiului nu trebuie făcută în „zig-zag" ca pentru leucocite, ci în zona centrală, deoarece la periferie ele apar, de obicei, tasate. Pentru examenul de detaliu se va alege o zonă în care eritrocitele sînt destul de apropiate, fără însă să se atingă. Dacă sînt prea înghesuite ele apar mai mici și ratatinate și nu permit distingerea detaliilor. Fenomenul contrar se constată pe frotiul întins prea subțire cînd eritrocitele apar rare și în aparență mai bine încărcate cu hemoglobină. Pînă la introducerea unui standard de apreciere generală a valorilor și a metodelor în hematologie, fiecare laborator e bine să aibă un criteriu de notare a constatărilor semicantitative care să fie interpretat identic de către clinicianul căruia i se adresează. Acest sistem poate fi exprimat fie prin semne aritmetice (—, ±, +, ++, +++), fie prin adjective ca *absent* (—), *discret* (±), *moderat* (+), *important* (++), *intens* (+++).

A. MORFOLOGIA ȘI STRUCTURA ERITROCITARĂ

1. MORFOLOGIA ERITROCITARĂ

a. **Formă și dimensiuni.** Forma eritrocitului normal este de disc biconcav cu marginile rotunjite (fig. 3-7). Acest aspect reprezintă o perfectă adaptare la funcția respiratorie, bazată pe difuziunea gazelor, deoarece sub această formă eritrocitele au suprafața cea mai mare la volumul cel mai redus. Forma biconcavă este rezultanta unei cooperări de forțe intrinseci și extrinseci.

Eritrocitele vertebratelor inferioare (pești, reptile, amfibii, păsări) sînt nucleate și au o formă ovală. Cu toată prezența nucleului, capacitatea funcțională specifică a acestor eritrocite este mai redusă (fig. 3-8).

Scanned with OKEN Scanner

Dimensiunile eritrocitelor prezintă valori constante, a căror evaluare este utilă pentru diagnostic. Cele mai importante particularităţi dimensionale sînt diametrul şi volumul. Eritrocitul normal are — într-o proporţie de circa 2/3 din cazuri — un diametru mediu de 7,2 μ. În condiţii normale există o deviere uşoară, atît peste, cît şi sub această valoare,

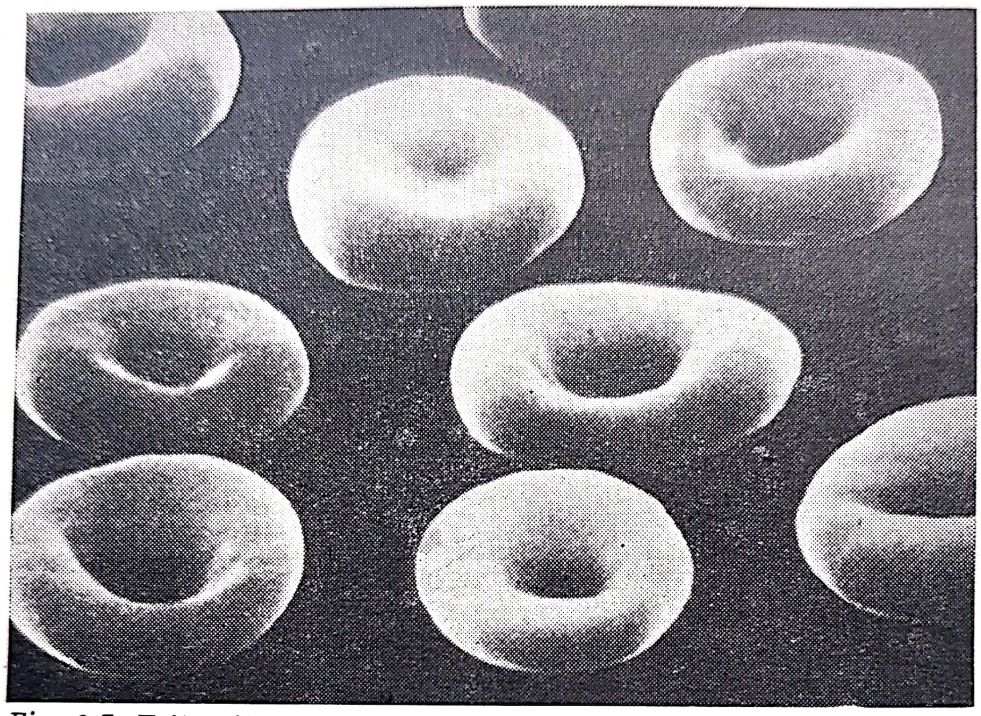


Fig. 3-7. Eritrocite normale văzute tridimensional cu ajutorul microscopului electronic stereoscan (Mărire 5 000 ×). (După H. J. Kayden şi M. Bessis, 1970).

care însă nu depăşeşte, în general, 1 μ, fenomen denumit anizocitoză fiziologică (vezi curba Price-Jones, pag. 186).

Grosimea eritrocitară este inegală, din cauza adînciturii din zona de mijloc, ceea ce face ca în centru să fie cu circa 1 μ mai mică faţă de zona premarginală. Grosimea eritrocitară medie este de circa 2 μ (fig. 3-9).

b. **Proprietăţile fizice ale eritrocitelor**

1) *Culoare.* Întinse în strat subţire pe frotiul necolorat, eritrocitele apar roz palide; în strat mai gros, această culoare se intensifică; masa eritrocitară are o culoare roşie închisă caracteristică. Culoarea dată de hemoglobina eritrocitară fiind prea slabă, se recurge la coloraţia panoptică May-Grünwald-Giemsa (MGG) care, deşi modifică nuanţa lor naturală, permite o mai bună studiere morfologică. Astfel prelucrate, ele apar mai intens colorate spre periferie, unde grosimea este maximă şi mai slab colorate la centru.

2) *Scintilaţia.* Eritrocitul matur nu este un corp inert şi rigid; în suspensie el prezintă unele mişcări vibratorii, din cauza cărora capătă, în lumina microscopului, un aspect scînteietor. Această proprietate s-ar datora unor mici diferenţe dintre densităţile substanţelor din membrană

Scanned with OKEN Scanner

și din mediul intraeritrocitar, care influențează indicii de refracție. Fenomenul nu se observă în unele stări patologice în care eritrocitele sînt rigide, de exemplu în siclemie; eritrocitele fixate pe lamă nu au această proprietate.

3) *Dispunerea în fișicuri (rulouri).* În circulația lor endovasculară, eritrocitele se deplasează în formă de fișicuri, fenomen ce simulează aglutinarea. Această dispoziție poate fi bine vizualizată, atît în picătura de sînge proaspăt, cît mai ales *in situ,* în vasele mezenterului

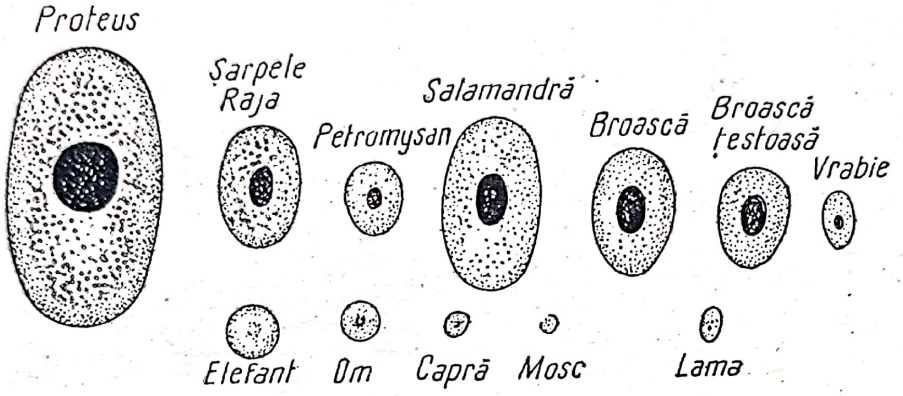
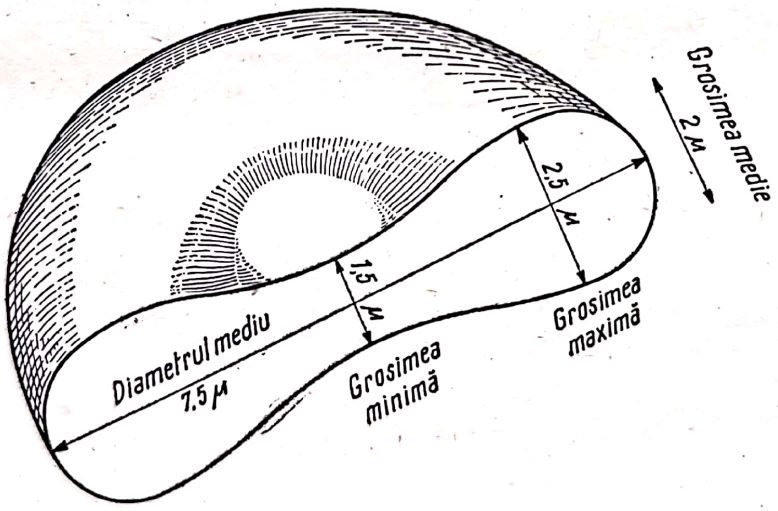


Fig. 3-8. Forma și mărimea eritrocitelor la diferite specii animale (după Schultz și Krüger, 1955).

Predomină forma nucleară ovalară; dintre eritrocitele anucleate ale mamiferelor (rîndul de jos), forma ovalară apare cu regularitate la tilopode, în exemplul dat, lama.



Suprafața medie (SEM) = 130 μ² (120-140)
Indicele de sfericitate (IS) = 3,4 (2,4-4,2)

Fig. 3-9. Secțiune imaginară prin eritrocit cu specificarea dimensiunilor medii.

de broască sau ale aripii de liliac. Dimensiunea acestor rulouri este în dependență, nu atît de calitatea eritrocitelor, cît mai ales de factorii plasmatici. Viteza de sedimentare, la rîndul ei, este dependentă de lungimea acestor fișicuri. Bolile însoțite de creșterea macroproteinelor plasmatice (fibrinogenul, globulinele etc.) se însoțesc de accelerarea sedimentării eri-

Scanned with OKEN Scanner

trocitelor; din contra, adăugarea, în sînge a unor soluții saline izotonice (ser fiziologic, substanțe anticoagulante, produși pentru conservarea sîngelui) împiedică așezarea eritrocitelor în rulouri, reducînd viteza lor de sedimentare.

Fig. 3-10. Secțiune transversală printr-un capilar subțire (după I. Rhodin, 1963).

În mijlocul capilarului se remarcă două eritrocite (Er), unul secționat pe mijloc, iar altul la nivelul unei prelungiri; alături se vede un trombocit (Th). Eritrocitul mare apare deformat și dens, cu conținut omogen (microscopie electronică, mărire 30 000×).

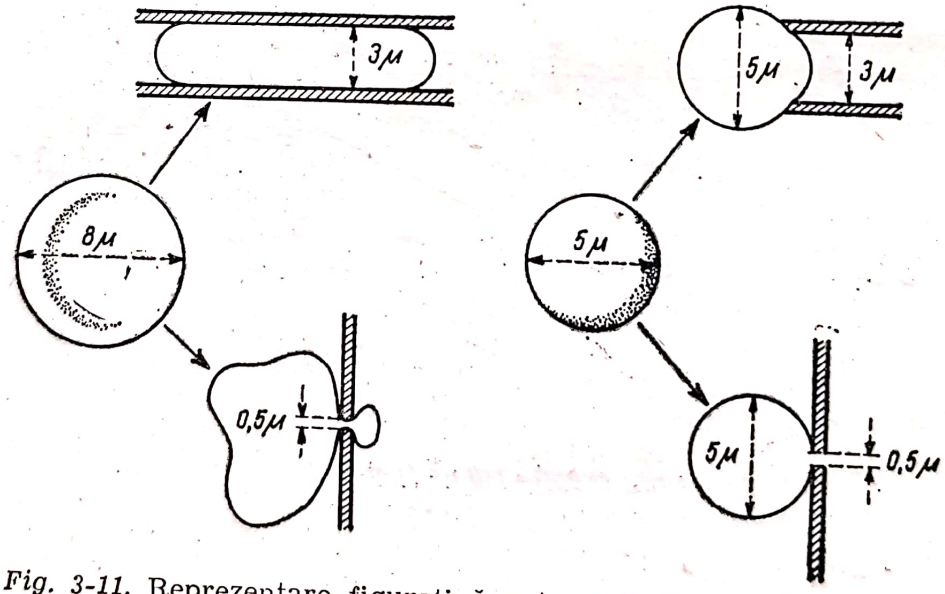


Fig. 3-11. Reprezentare figurativă a trecerii discocitului și sferocitului printr-o pipetă cu diametrul îngust (după M. Bessis, 1973).

La stînga sus, un discocit este în măsură să traverseze un canal lung (pipetă) cu un diametru de 3 μ, întrucît suportă o întindere de 14 μ; *jos*, același eritrocit poate trece printr-un orificiu cu o deschidere și mai îngustă dacă lungimea canalului este scurtă. *La dreapta*, sferocitul nu poate trece prin aceste orificii din cauză că raportul suprafață-volum nu-i permite această deformare.

Scanned with OKEN Scanner

Cînd circulația sîngelui este rapidă (deplasare în vase mari) eritrocitele iau formă aerodinamică (fuziformă).

4) *Elasticitatea* (deformabilitatea reversibilă). Eritrocitele posedă o elasticitate remarcabilă; din cauza acestei proprietăți ele pot trece prin capilare, care au adesea un diametru mai mic decît cel eritrocitar. Traversarea capilarelor înguste se face prin modificarea formei eritrocitelor după calibrul acestora, după care își revin la forma inițială (fig. 3-10). Wood (336) a obținut imagini microcinematografice ce ilustrează pasajul eritrocitelor prin astfel de spații înguste. *In vitro* s-a urmărit trecerea lor prin filtre cu micropori și prin micropipete cu un calibru sub 3 μ sau prin orificii și mai înguste la o presiune negativă de numai 4 mm de apă (fig. 3-11). Vasoconstricția nu împiedică înaintarea eritrocitelor; fără această capacitate de deformare ar urma ca în zonele de vasoconstricție ele să se aglomereze foarte mult (305).

2. STRUCTURA ERITROCITARĂ

Cu toată simplitatea lor aparentă și cu toate că s-a apelat intens la ajutorul tehnicilor moderne de investigație, structura eritrocitelor ascunde încă numeroase necunoscute. Cîtă vreme cercetarea eritrocitelor cu ajutorul microscopului optic nu a putut aduce date noi în legătură cu structura lor, anumite tehnici noi au permis deslușirea unor detalii structurale și funcționale necunoscute pînă atunci (31, 165, 262, 306).

a. **Compoziția chimică a eritrocitelor.** Eritrocitul este format în proporție de 60% din apă, 33—35% din hemoglobină și 5—7% alte substanțe. Conținutul eritrocitului în apă este intermediar față de alte celule, de exemplu ficatul are o concentrație apoasă de 75%, rinichii de 80%, substanța cenușie a creierului de 85%, pe cînd sistemul osos conține 25—30%, iar țesutul adipos doar 20% apă. Hemoglobina în suspensie apoasă nu poate depăși 1/3 din greutatea eritrocitară. Reziduul uscat nehemoglobinic intră, în cea mai mare parte, în alcătuirea membranei. Compoziția chimică a eritrocitelor este redată în tabelul 3—2. Concentrația în electroliți în interiorul eritrocitelor este diferită de cea a plasmei (tabelul 3-3).

b. **Membrana eritrocitară.** Pornind de la presupunerea că membrana eritrocitară are aceeași structură de bază ca a tuturor celorlalte membrane celulare și a subunităților citoplasmatice (mitocondrii, reticul endoplasmic etc. arătate la cap 1, pag. 23) vor fi amintite numai particularitățile ce interesează eritrocitul. Membrana eritrocitară este studiată de morfologiști, fiziologi, chimiști, biofizicieni etc. prin procedee foarte variate: cercetarea scheletelor sau „fantomelor" eritrocitare care rămîn după ce hemoglobina a fost îndepărtată (fig. 3-12), cercetarea electronomicroscopică și la stereoscan a unor secțiuni ultrafine efectuate după incluzionarea sau înghețarea eritrocitelor, după care urmează fracturarea blocurilor (criodecapaj) (fig. 3-13), studiul fracțiunilor proteice prin centrifugare, studierea porțiunilor de membrană cu ajutorul razelor X, precum și alte procedee fizice (31, 303).

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 3-2

Compoziția chimică aproximativă a eritrocitelor umane
(După M. Wintrobe, 1967)

Stroma	În g/100 ml eritrocite
Hemoglobină	33,50
Methemoglobină	0,40
Proteine nehemoglobinice	0,87
Lipide	0,48
Glucoză	0,83
Minerale	0,67
Apă	63,15
Proteine totale	*500*
Stromatina	300
Elinina	200
Substanțe de grup sanguin	
Enzime	
Lipide totale	*488*
Fosfatide (în % din totalul lipidelor fosforice)	
Lecitina	
Fosfatidil-etanol-amina	
Fosfatidil-serina	
Sfingomielina	
Lizolecitina	
Colesterol (liber)	130
Colesterol esterificat	29
Grăsimi neutre, chebrozide	98
Sistem glicolitic total	*188*
Glucoză	74
Substanțe reductoare înglobate la glucoză (2,3-difosfoglicerat, ATP, hexozofosfați, NAD, NADPH)	144
Glutation redus	*66*
Compuși metalici și metaloidici, total	*767*
P: acid fosforic organic solubil	55
fosfor anorganic	3
ATP—P	10
hexozo-mono+difosfat P	15
2-3-difosfoglicerat P	28
S: sulf neutru	6
Sulfat anorganic	0,04
Sulfat eteric	0,04
Cupru	0,115
Zinc	1,44
Plumb	0,057
Staniu	0,026
Magneziu	0,019
Aluminiu	0,007
Argint	urme

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 3-2 (continuare)

Stroma	În mg/100 ml eritrocite
K^+	362
Na^+	20
Ca^{++}	2
Mg^{++}	6
Cl^-	78
Alte substanțe	
Vitamine și coenzime	
Tiamina	0,008
Carbolixază	0,01
Riboflavina	0,022
Flavin-adenin-dinucleotid	0,075
Niacina	1,0
NAD	10
NADP	1,2
Piridoxin	0,005
Acid pantotenic	0,025
Coenzima A	0,144
Acid ascorbic	1,0
Adenozin-mono-di- și trifosfat	62
Compuși hemoglobinici	
Fier	115
Protoporfirină liberă	0,025
Coproporfirină liberă	0,025
Variate	
Acizi aminați	12
NPN total	44
N-nucleotid	13
N-amino-acid	7,4
Uree	20
Creatină	8
Creatinină	2
Acid uric	2

Tabelul 3-3

Compoziția ionică a mediului interior al eritrocitului în comparație cu a plasmei (în mEq/l)

	în hematii	în plasmă
Apă	60%	90%
Cationi: K^+	90—110	5
Na^+	10—16	140
Total:	160	
Anioni: Hemoglobina	80	—
Cl^-	5	100
Bicarbonați	25	25
Total:	160	

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 3-12. Microfotografia electronică a unei „fantome eritrocitare" preparată prin liză osmotică. (După L. S. Lessin, W. N. Jensen şi P. Klug, 1972).

Suprafaţa apare cu aspect granulat, presărată cu „plăci" şi „pori". În stînga sus, detalii din aceeaşi figură.

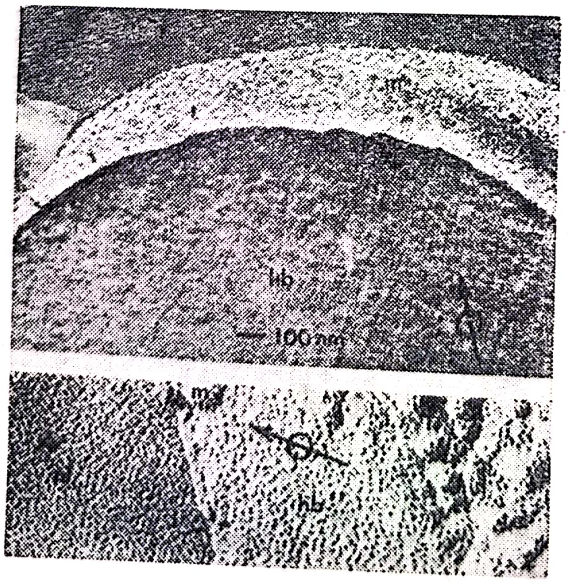


Fig. 3-13. Membrană eritrocitară după fracturarea sferocitului îngheţat în vid la 196° (după J. A. Sirs şi C. Stolinski, 1971).

Sus, falia membranei de-a lungul marginii de fractură (ts). Cifrele (1, —2, —3) indică grosimea membranei. M=membrana care înconjură eritroblastul; hb=hemoglobina; pl=plasma; ← direcţia umbrei de platinare (microscopie la stereoscan, mărire de 66 000 ×). *Jos,* aceeaşi imagine mărită de 440 000 ×.

Plecînd de la premiza că eritrocitul este o celulă ultraspecializată în transportul oxigenului, structura acestuia este de asemenea adaptată acestei funcţii. Pentru a avea maximum de suprafaţă şi de supleţe la minimum de volum, membrana eritrocitară s-ar compune din mai multe straturi lamelare concentrice formate din lipide, protide, glucide, electroliţi şi apă (fig. 3-14) (31, 40, 114, 120, 143, 170, 277, 291, 337).

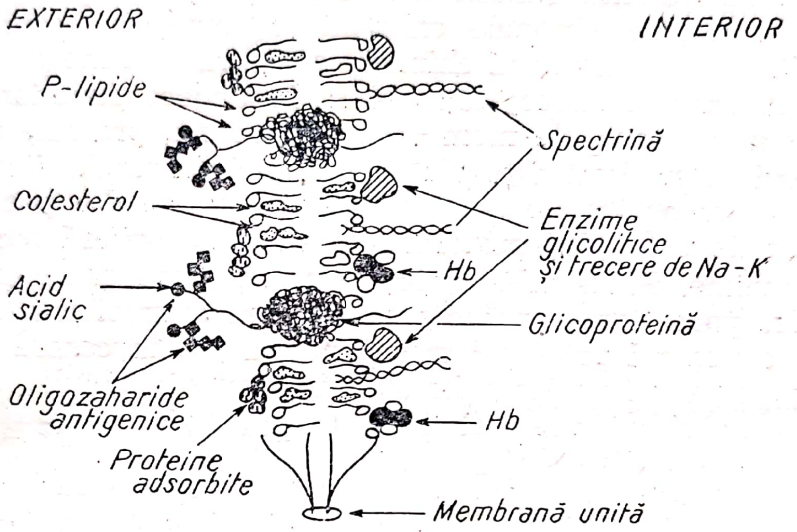


Fig. 3-14. Schemă ipotetică a structurii membranei eritrocitare (după L. S. Lessin, W. N. Jensen şi P. Klug, 1972).

Membrana eritrocitară apare în secţiune alcătuită din mai multe straturi concentrice: 1. Stratul extern alcătuit din mucoproteine bogate în acid sialic (acid acetil neuraminic); acesta imprimă eritrocitului încărcătura negativă determinînd respingerea reciprocă eritrocitară şi contribuind astfel la stabilitatea suspensiei lor în plasmă; purtătorii sarcinilor electrice sînt grupările carboxil ale acestui acid. 2. Un strat protetic de elinină, precum şi anumite lipide şi substanţe specifice de grup sanguin. 3. Un strat bimolecular fosfolipidic; acest strat nu este polarizat şi prin aceasta este hidrofob; 4. Un strat format dintr-o proteină structurală, numită spectrină (cu structură fibrilară elastică care ar imprima eritrocitului forma de disc biconcav), pe care ar fi adsorbit stratul intern; 5. Un strat monomolecular de hemoglobină intim legată de membrană.

Întrucît trecerea de la forma de discocit la aceea de sferocit se face, de regulă, fără o modificare a volumului, rezultă cu necesitate o reducere a suprafeţei ceea ce, teoretic, se poate realiza prin trei mecanisme: pierderea de material din membrană (ceea ce nu este cazul la eritrocite întrucît aceste stări sînt reversibile), încreţirea membranei (fapt neconfirmat, suprafaţa sferocitului apărînd netedă la microscop), schimbarea grosimii membranei (fapt demonstrat, atît prin vizualizare la microscopul electronic după îngheţare şi spargerea eritrocitului, cît şi prin alte metode fizice) (31, 291).

Astăzi, în urma unor studii electronomicroscopice, se impun observaţiile mai vechi ale lui Hilleri şi Hoffman (1953) care au presupus că membranele izolate de eritrocit sînt alcătuite din plăci lipidice cuprinse într-o reţea de fibre, peste care s-ar adăuga un strat proteic, legat mai

puţin strîns de aceste plăci, strat ce nu poate fi îndepărtat prin spălarea fantomelor celulare (137). Cercetările lui Dourmashkin şi colab. (1962) aduc date noi după care membrana ar fi alcătuită din cilindri lipidici înconjuraţi de proteine, formînd împreună un mozaic; diametrul acestor plăci ar fi de circa 50 nm, cînd eritrocitul are o formă de disc şi de circa 160 nm cînd forma este sferoidală. În felul acesta eritrocitul îşi poate reduce suprafaţa, volumul rămînînd constant (291).

Proteinele din membranele eritrocitare reprezintă componenta cea mai variabilă, atît ca structură chimică, cît şi ca grosime a straturilor ce tapetează structurile lipidice; din punct de vedere funcţional sînt elementele cele mai active ale membranei. Structura proteinelor este diferită la nivelul celor două feţe ale membranei (externă şi internă). Din analiza membranelor izolate s-a constatat că unele din proteine au rol structural, ca de exemplu, proteina contractilă fibrilară (spectrina), iar altele sînt enzime. Proteinele enzime sînt în mare parte lipido-dependente; ele fac parte integrantă din membrana eritrocitară (137). Proteinele enzime au ca rol principal transportul activ, în contra gradientului de concentraţie, a diferitelor substanţe în, sau din celulă; ele mai iniţiază şi susţin activitatea metabolică a celulei.

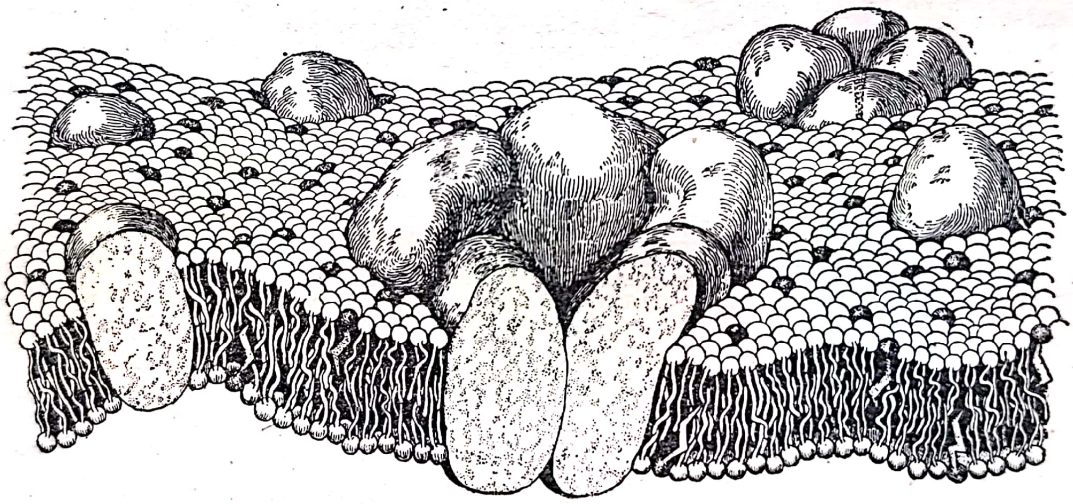


Fig. 3-15. Reprezentare figurativă a structurii dublu lipidice a unei membrane celulare (după M. M. Mayer, 1975).
Bilele albe reprezintă extremităţile moleculare fosfolipidice hidrofile, iar cele gri extremităţile moleculare sterolice; cozile albe reprezintă prelungirile mobile ale moleculelor fosfolipidice, iar cele gri prelungirile rigide ale celor sterolice. Proteinele membranei plutesc în matricea lipidică asemenea unor *iceberg*-uri pe o mare cu vălurele. Proteinele, mai ales enzime, sînt dispuse grupat, ceea ce explică transportul prin „pori" proteici activi prin care circulă, sub control, moleculele mici şi ionii, împotriva gradientului de concentraţie intra- şi extracelular (200 a).

Lipidele alcătuiesc, cantitativ, partea cea mai importantă a structurii membranelor eritrocitare. Procentul cel mai ridicat revine fosfolipidelor (60—70%) apoi colesterolului (20—30%) şi glicoproteinelor (10—15%). Metabolismul lipidelor, în sensul unor sinteze *de novo* lipseşte în eritrocitul matur; au loc însă schimburi foarte active între lipidele plas-

Scanned with OKEN Scanner

mei și cele ale membranei eritrocitare (31, 143, 179, 291). Integrarea lipidelor în membrana eritrocitară are o importanță fundamentală în menținerea structurii, funcției și duratei de viață a eritrocitelor, în condiții normale sau patologice.

Glucidele reprezintă o fracțiune chimică mai redusă cantitativ; ele intră în compoziția, atît a glicoproteinelor, cît și a glicolipidelor și sînt reprezentate, în principal, de hexoze, hexozamină, acid sialic și altele. Proprietățile imunologice specifice ale eritrocitelor se bazează pe particularități de structură chimică a unor glicoproteine; astfel, structurile care formează substratul diferitelor antigene de grupe sanguine au la bază anumite proporții și secvențe de oligozaharide (143). Sarcina electrică negativă a eritrocitelor este condiționată de acidul N-acetil neuraminic (acidul sialic) legat de aceste glicoproteine (143). Prin extracție alcalină se obține o fracțiune solubilă numită proteina S și un reziduu, *stromina*. Din stromină se obține *elininina* care este un complex heterogen glicolipoproteic cu o greutate moleculară de 40 000 000 și dimensiuni de 10 000 Å pe 125 Å.

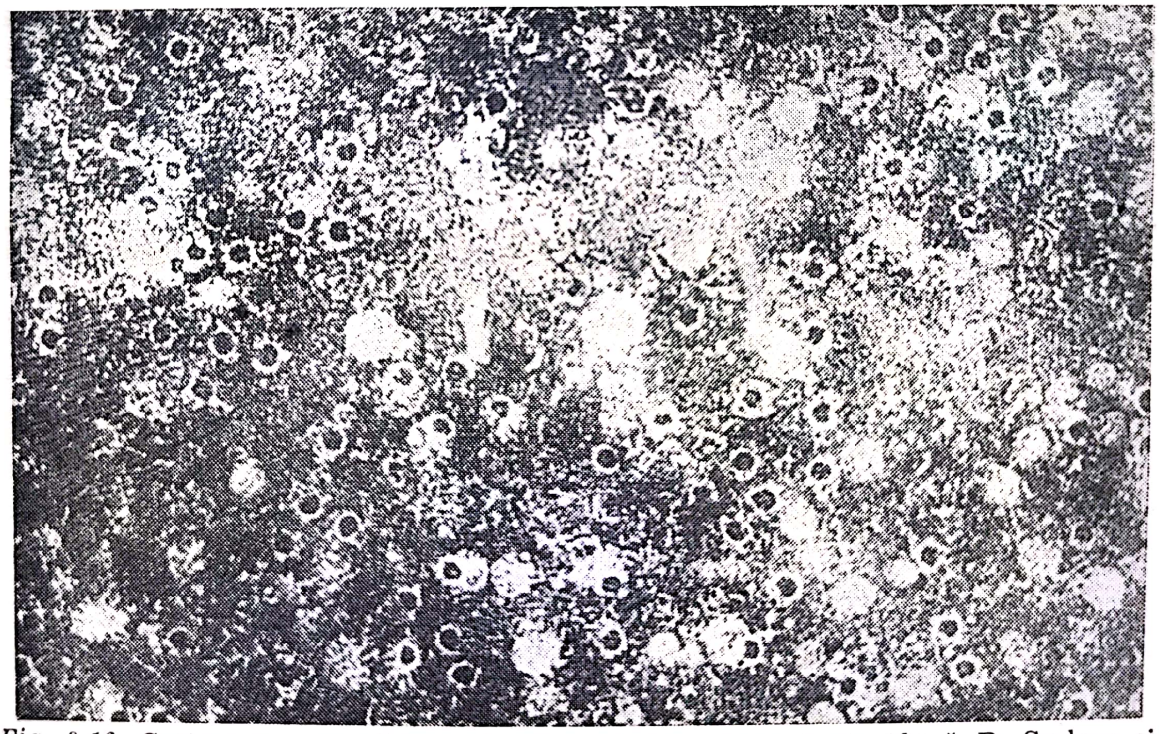


Fig. 3-16. Cratere pe suprafața eritrocitară induse imunologic (după P. Seehan și G. H. Iles, 1973).

Suprafața externă a eritrocitelor, asupra cărora a acționat un sistem anticorp-complement, prezintă orificii cu un diametru de 195/105 Å. Microscopie electronică, colorație negativă; mărire × 174 000 (31).

Aspectul suprafeței eritrocitare la microscopul electronic. Metoda „amprentelor", folosită de Bessis și colab. și de alții, a permis observarea suprafeței eritrocitare ca și cum ar fi imprimată pe o peliculă. Prin examinare la microscopul electronic s-a putut recunoaște pe suprafața eritrocitelor prezența unor neregularități, mai mult sau mai puțin rotunde

Scanned with OKEN Scanner

(„cratere"), care par să aibă un relief mai accidentat decît restul suprafeţei eritrocitare. În anumite condiţii experimentale (conservarea sîngelui timp de 3—4 zile, încălzirea la circa 55°C, suspendarea sîngelui în soluţie de ser fiziologic timp de mai multe ore) dimensiunile şi numărul lor creşte considerabil (fig. 3-16).

Microscopia electronică la stereoscan, cu fracturare după îngheţare, a permis descrierea unor detalii suplimentare ale suprafeţei eritrocitare. Metoda îngheţării şi fracturării a permis clivarea mediană a membranei în două semimembrane cu observarea detaliilor de pe 4 suprafeţe: faţa externă a semimembranei externe, faţa internă a semimembranei externe (IS-A), faţa externă a semimembranei interne (IS-B) şi faţa internă a semimembranei interne (fig. 3-17) (31, 185).

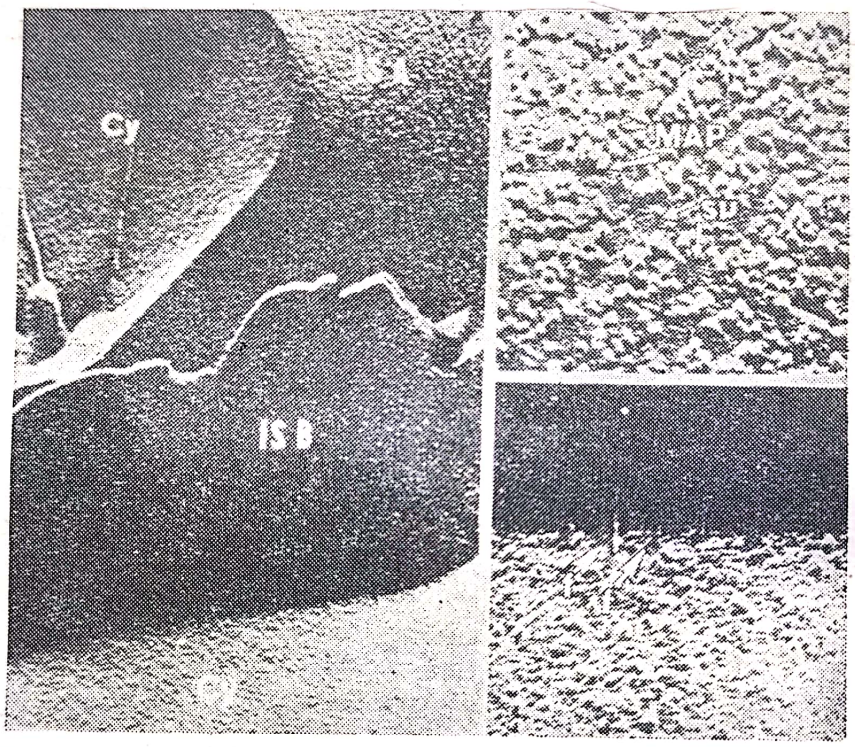


Fig. 3-17. Relaţii ale foiţelor membranei eritrocitare văzute la steroscan după îngheţare şi fracturare lamelară (criodecapaj) (după L. S. Lessin, W. N. Jensen, P. Klug, 1972).

Microfotografie la stereoscan după despicarea prin fracturare a membranei eritrocitare după îngheţare (stînga). Citoplasma celulei de sus (Cy) are în dreapta ei faţa internă a membranei externe (IS A) pe a cărei suprafaţă apar microparticule (MAP=membrane associated particles); *mijloc:* faţa externă a membranei interne (IS-B); *jos:* particule citoplasmatice; *dreapta sus:* IS-A apare cu MAP mult mărite; ele sînt plasate pe o matriţă de subparticule hexagonale (su); *dreapta jos:* zona dintre faţa internă a membranei şi citoplasma pe care se văd filamente (f) ce pătrund pe alocuri în citoplasmă.

Figurile mielinice sînt resturi de lipide provenite din membrana eritrocitară grupate fără un aranjament anume (24, 29). Conţinutul mare de lipide a membranei face ca, în majoritatea cazurilor de alterare eritrocitară, să apară figuri mielinice. Aceste formaţiuni au fost descrise

încă de Virchov și Nageotto; denumirea a fost sugerată de asemănarea cu imaginile observate la amestecul apei cu mielina celulelor nervoase, care sînt foarte bogate în fosfolipide. Microscopia electronică a permis deslușirea unor detalii în legătură cu aceste aspecte. În cursul hemolizei, fos-

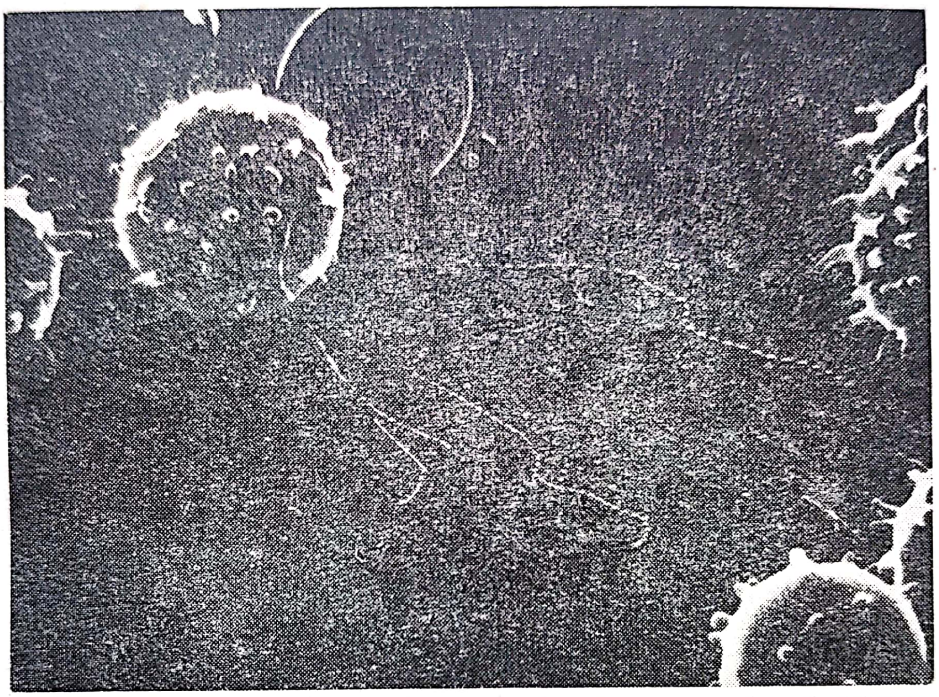


Fig. 3-18. Figuri mielinice observate la stereoscan (după M. Bessis și P. Mandon, 1972).

Eritrocitele apar ca niște sfere din care se desprind microsferule în formă de șirag de perle ce se agită în lichidul de suspensie (mărire de 7 150 ×).

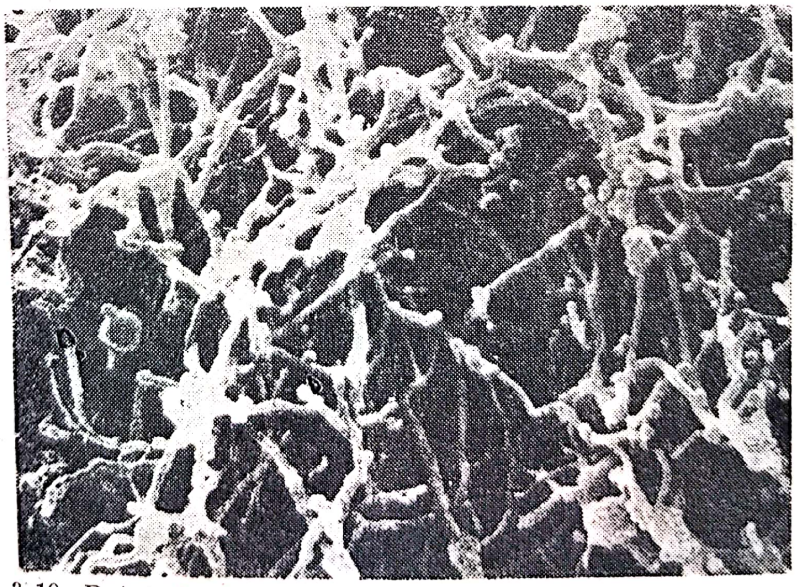


Fig. 3-19. Rețea de forme mielinice în lichidul supernatant după tratarea eritrocitelor prin metoda despicării prin congelare apoi centrifugare (Stereoscan, mărire 10 000×) (după M. Bessis, P. Mandon, 1972).

Scanned with OKEN Scanner

folipidele eritrocitare se separă luînd formă de filamente îngroșate la capete, sau a unor șiraguri de mărgele (fig. 3-18). Unele rămîn atașate de suprafața eritrocitelor dîndu-le un aspect de „cap de meduză"; altele se separă de ele fiind animate de mișcări browniene foarte intense, motiv pentru care au fost, uneori, confundate cu microorganismele. Figurile mielinice se observă, de asemenea, în interiorul eritrocitelor normale uzate și fagocitate, intrate într-un anumit grad de digestie, precum și în anumite maladii eritrocitare (talasemie, anemii hemolitice dobîndite etc.).

Între figurile mielinice și formațiile crateriforme există anumite raporturi; substanțele hemolizante, care duc la accentuarea craterelor, favorizează și apariția figurilor mielinice. Fenomenul trebuie atribuit hidratării accentuate a lipidelor. Sîngele conservat timp de 8 săptămîni pierde circa 30% din lipidele membranelor. Figurile mielinice pot fi izolate de eritrocite prin centrifugare în plasma supernatantă (29) (fig. 3-19).

c. **Stroma eritrocitară** sub forma unei rețele fixate pe membrană, care s-ar prelungi în interiorul eritrocitului, este contestată de citologi; aceștia susțin că scheletul eritrocitului ar consta din membrana ce conține o proteină contractilă care-i imprimă și forma caracteristică. Autori mai vechi au imaginat interiorul eritrocitului împînzit de o rețea fină (mai densă spre periferie și mai rară în interior), asemănîndu-l cu un burete în ochiurile căruia s-ar afla hemaglobina, în parte adsorbită. În sprijinul existenței acestei rețele au argumentat că eritrocitele secționate de mai multe ori își refac structura, continuînd să circule sub formă de schizocite. Cu ajutorul mijloacelor tehnice actuale cu mare putere de mărire nu s-a reușit, pînă în prezent, decelarea structurii interne a eritrocitului uman.

B. ANTIGENELE ERITROCITARE

Antigenele (aglutinogenele) sînt complexe chimice care, introduse într-un organism ce nu le posedă, sînt capabile să declanșeze reacții imunitare de tip celular sau prin anticorpi. Noțiunea de antigen este mai mult de ordin biologic decît biochimic. Reacția la antigene prezintă două aspecte corelate: *antigenicitatea* (producerea de anticorpi) și *specificitatea* (capacitatea anticorpilor produși de a reacționa exclusiv cu un anumit tip de antigen) (37, 126, 246).

În legătură cu structura antigenelor, este necesară rememorarea pe scurt a cîtorva noțiuni:

— *haptena* (antigen incomplet) este o moleculă cu structură relativ simplă, incapabilă de a induce formare de anticorpi decît dacă se atașează de un suport molecular mai mare (cuv. gr. *haptein* = a atașa), căruia îi imprimă specificitate; haptenele sînt în general de natură polizaharidică;

— *gruparea determinantă* (purtătoare de haptene) este capabilă să inducă formarea de anticorpi, dar nu posedă specificitate; această fracțiune este, în general, o proteină.

Antigenele eritrocitare aparţin familiei de macromolecule glicoproteice, a căror greutate moleculară variază între 300 000 şi 1 000 000. Molecula lor este alcătuită dintr-un schelet protidic, de care se fixează, prin legături covalente, un mare număr de lanţuri oligozaharidice cu dispoziţie arborescentă (fig. 3-20). Peptidul nu joacă decît un rol indi-

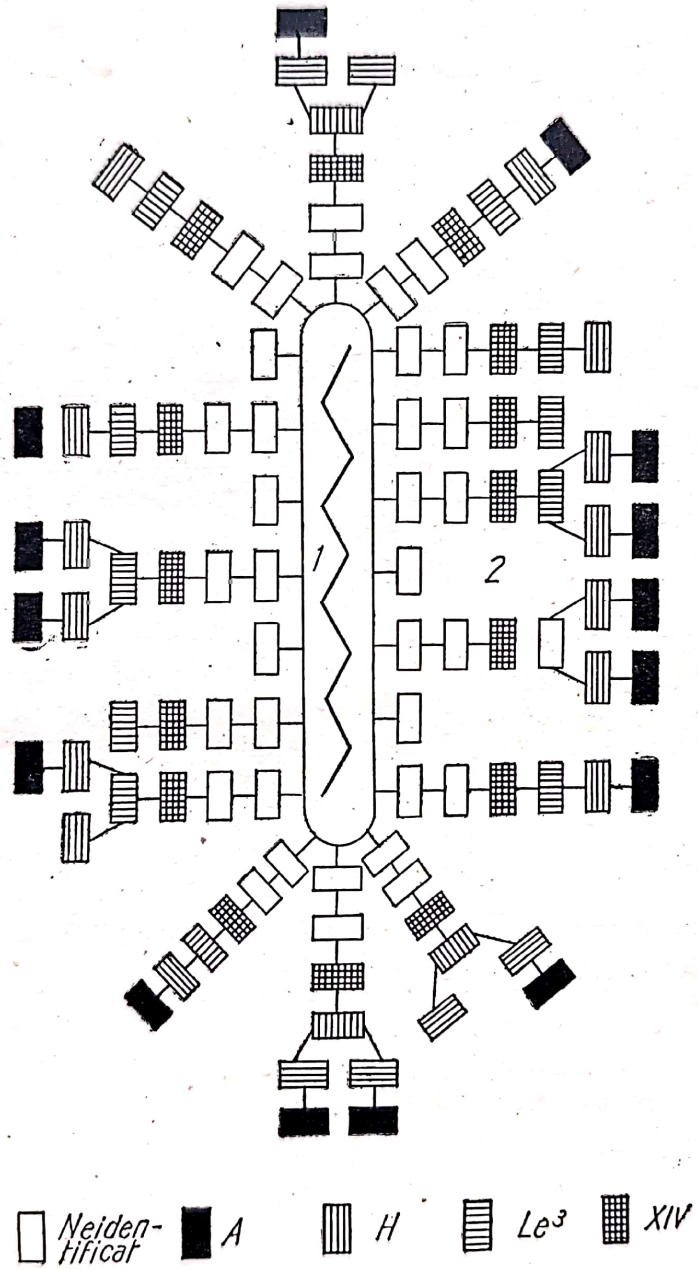


Fig. 3-20. Reprezentare schematică a structurii unei substanţe de grup sanguin A (la un subiect Se Le). (După J. Reviron, 1972).

O substanţă cu o greutate moleculară de 500 000 poate conţine circa 300 astfel de anexe colaterale, alcătuite fiecare din circa 6—8 molecule de monozaharide. Componenţa zaharidică reprezintă 70—90% din ansamblul molecular; ea este cea care imprimă, în cea mai mare măsură, structura antigenică specifică. *Legendă:* 1=osatura peptidică; 2=porţiunea oligozaharidică.

Scanned with OKEN Scanner

rect în determinarea specificității antigenice, probabil prin menținerea orientării spațiale a lanțurilor oligozaharidice (325).

Specificitatea reacțiilor imunochimice este foarte mare; pentru unele tipuri de antigene, selecția anticorpilor poate merge pînă la tipul de izomerie (forma orto-, meta-, para-; levo-, dextro-, mezo-; cis sau trans). Pentru alte substraturi însă, anticorpii nu pot distinge lanțuri de carburi alifatice cu lungimi variabile sau diferitele molecule ciclice. Această specificitate este imprimată, în principal, de caracterul stereochimic al moleculei.

Fiecare antigen are un număr variabil de *arii active* care sînt capabile de a induce formarea de anticorpi corespunzători; numărul acestor arii reprezintă valența antigenului. În general, cu cît o moleculă este mai mare și mai complexă, cu atît posedă un număr mai ridicat de zone combinative; cele mai multe se găsesc la suprafața moleculei unde sînt mai accesibile pentru combinarea cu anticorpul. Molecula de mioglobină are, de exemplu, 4 zone de grupări combinative situate între acizii amiați 15—33, 56—69, 77—89 și 139—153. Trei dintre acestea se găsesc la „coturile" polipeptidului, iar ultima în extremitatea sa N terminală, toate fiind zone ușor accesibile pentru combinare.

Eritrocitele au o structură antigenică deosebit de complexă cu determinanți antigenici, atît la suprafața lor, cît și în mediul lor intern. Suprafața eritrocitară este un mozaic antigenic; unele din antigene au o valoare majoră iar altele mai redusă; o parte din ele constituie particularități antigenice individuale.

Varietatea antigenică a eritrocitului, cuprinsă în cadrul complex al „grupelor sanguine" nu reprezintă decît o parte din varietatea antigenică a organismului. Din numeroase alte sisteme antigenice amintim grupele tisulare din sistemul HL—A, existente și pe leucocite, antigenele trombocitare proprii, sistemele antigenice ținînd de proteine serice etc. La om au fost definite pînă în prezent 14 sisteme de grup sanguin care cuprind peste 100 de antigene (88, 303), (tabelul 3—4).

Tabelul 3-4

Sisteme	Antigene
ABO	A_1, A_2, B, O
Rhesus (C, D, E, c, d, e)	$DD^{u}d$, $CC^{w}c$, Ee, Ff
Kell-Cellano	K, k, Kp^{a}, Kp^{b}, Js^{a}, Js^{b}
Duffy	Fy^{a}, Fy^{b}, Fy (ipotetic)
Lewis	Le^{a}, Le^{b}
MNSs	M, N, S, s
Kidd	IK^{a}, IK^{b}
Lutheran	Lu^{a}, Lu^{b}
P	P_1, P_2, p
Diego	Dj^{a}, Di, Dj^{b} (ipotetic)
I—i	I—i
Xg	Xg^{a}

1. SISTEMUL ABO

Impărţirea indivizilor după „grupele sanguine" cu importanţă majoră (sistemul ABO) se bazează pe prezenţa sau absenţa pe suprafaţa eritrocitară a două antigene puternice (A şi B) şi pe prezenţa în serul lor a altor anticorpi specifici (anti-A, anti-B) care corespund antigenelor absente. Antigenele A şi B de pe suprafaţa eritrocitelor umane sînt prezente şi în diferite alte celule şi ţesuturi ale organismului uman şi chiar în secreţii (salivă, suc gastric, exsudate etc.) precum şi la numeroase specii sau produse de animale (porc, bou, cal, ouă de păsări, melci), vegetale (seminţe, tuberculi, fungi) şi la numeroase bacterii (Escherichia coli, C. freundi) (99, 193, 257, 303).

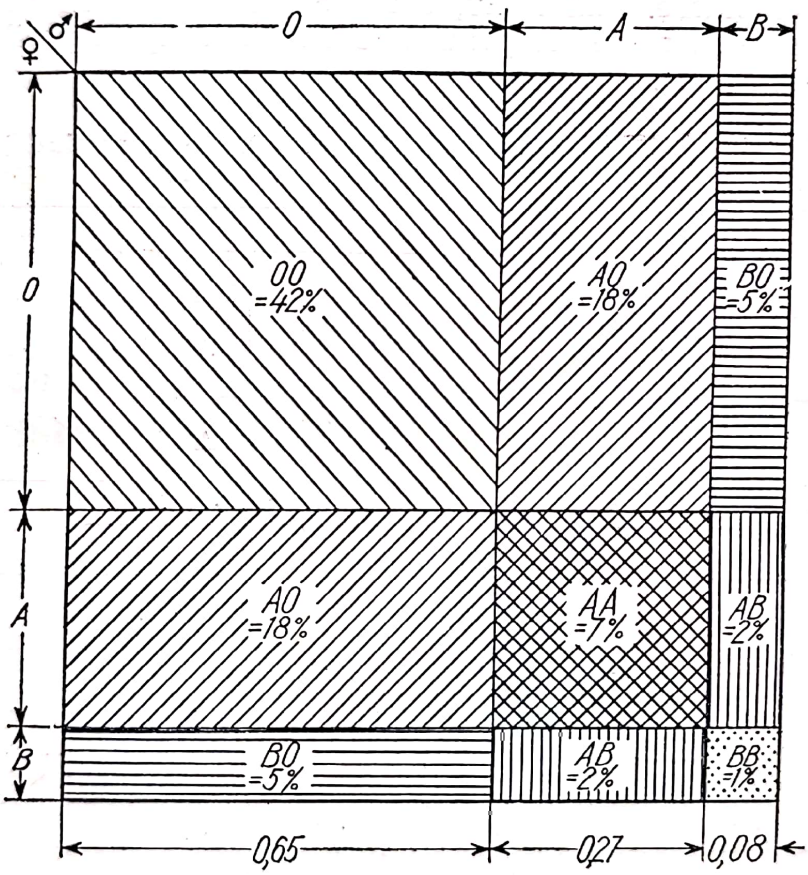


Fig. 3-21. Frecvenţa diferitelor grupe sanguine din sistemul ABO pe baza a 13 665 determinări efectuate între 1950 şi 1963 de W. Bitnner (1963).

Cele 6 grupări genotip (OO, AA, AO, BB, BO şi AB) corespund celor 4 grupe sanguine clasice (A, B, O şi AB). Reiese atît frecvenţa genelor cît şi proporţiile de homo- şi heterozigoţilor din grupele A şi B.

Apariţia substanţelor de grup A şi B este foarte timpurie, existenţa lor poate fi detectată şi la embrionul de cîteva săptămîni. Cu toate acestea, receptorii A şi B nu sînt complet dezvoltaţi la naştere şi creează uneori dificultăţi în determinarea grupelor sanguine la nou-născuţi.

Frecvenţa grupelor ABO este variabilă după ţară. În România frec-

venţa lor este aproximativ următoarea: grupa O (I) = 36%; grupa A (II) = 41%; grupa B (III) = 16%, iar grupa AB (IV) = 7%. (168 h).

Factorii sistemului ABO se transmit după legile mendeliene. Genele care determină sinteza antigenelor A, B, O prin modificarea unei substanţe precursoare, sînt situate pe acelaşi locus la nivelul unei perechi de cromozomi somatici, fiind deci, gene alelomorfe, un individ putînd avea cel mult două din ele. Deoarece caracterele A şi B sînt dominante asupra caracterului O şi codominante între ele, grupele A şi B pot să corespundă la două genotipuri, unul homozigot (AA sau BB) şi altul heterozigot (AO sau BO). Grupa O este formată totdeauna din cele două alele recesive (deci obligatoriu homozigotă). Grupa AB este formată din cele două alele codominante. În tabelul 3—5 şi fig. 3—21 sînt ilustrate aceste modalităţi de combinare. Mai tîrziu, odată cu recunoaşterea subgrupei A_2, s-a admis existenţa a 4 alele principale cu 6 fenotipuri posibile: O—A_1, A_2—B, A_1—B, A_2—B.

Tabelul 3-5

Posibilităţi de combinare a antigenelor A (de pe verticală) cu antigenele ABO (de pe orizontală)

Combinaţia 1	A		A		Descendenţi
	Genotip	Fenotip	Genotip	Fenotip	
A	AA	A	AA	A	100%
A	AA	A	AA	A	
Combinaţia 2	**A**		**O**		
	Genotip	Fenotip	Genotip	Fenotip	
A	AA	A	AO	A	100%
A	AA	A	AO	A	
Combinaţia 3	**B**		**O**		
	Genotip	Fenotip	Genotip	Fenotip	
A	AB	AB	AO	A	25% AB; 25% A
O	BO	B	OO	O	25% B; 25% O
Combinaţia 4	**O**		**O**		
	Genotip	Fenotip	Genotip	Fenotip	
A	AO	A	AO	A	50% A
B	BO	B	BO	B	50% B

Scanned with OKEN Scanner

a. **Antigene legate de sistemul ABO**

1) *Grupele A forte și slabe.* Grupul A cuprinde mai multe variante din care 2 sînt cele mai importante:

— *varianta A „forte" sau* A_1, aglutinată puternic de către toate serurile anti A cu condiția să fie în titru suficient și

— *varianta A „slabă" sau* A_2, pentru care anumite seruri anti-A (în special cele slabe) prezintă variații importante de putere aglutinantă.

Între aceste variante nu există diferențe de ordin calitativ. Se consideră astăzi că un ser anti-A are două componente: o aglutinină anti-A (capabilă să reacționeze, atît ca antigenul A_1, cît și cu antigenul A_2) și o aglutinină anti-A_1 care aglutinează numai eritrocitele de grup A_1, nu și pe cele A_2 (20). Varianta A_1 se găsește într-o proporție de circa 82%, iar varianta A_2 într-o proporție de circa 18%. Existența alelei A_2 are o importanță practică deosebită deoarece eritrocitele indivizilor de grupa A_2 B pot să nu reacționeze cu seruri test anti-A mai slabe și să fie considerate (greșit) de grupa O, respectiv B, ceea ce poate duce la accidente transfuzionale grave. În plus, în serul indivizilor de grupă A_2 sau A_2B poate apărea o aglutinină anti-A_1, care poate fi uneori cauza unor accidente transfuzionale.

Varianta A_3 (considerată ca o formă mai slabă a variantei A_2) se găsește într-o proporție de 1 la 1 000 de indivizi din grupa A sau la circa 1 la 2 000 de indivizi din totalul populației.

Alte fenotipuri din grupa A, mult mai slabe și mai rare decît A_3 (A x, A_4, A_5, A0 etc.) au fost clasificate în două grupe principale Ax și Am.

2) *Factorul H.* Acest factor care reprezintă substratul aglutinării eritrocitelor de grup O de către „seruri anti H", nu este de fapt un antigen specific pentru eritrocitele de grupă O, și este considerat un precursor al substanțelor de grupa A și B (20).

3) *Fenotipul Bombay.* Bhende și colab. (1952) au descoperit în Bombay un subiect ale cărui eritrocite nu aglutinau în contact cu anticorpii anti A și anti B, dar nici cu anticorpii anti H, serul lor însă, pe lîngă aglutinina anti-A și anti-B, conținea și anti-H, spre deosebire de indivizii din grupa O adevărată. Ulterior s-au descoperit și alte cazuri.

b. **Anticorpii în sistemul ABO**

1) *Anticorpii naturali anti A și anti B* sînt prezenți în toate cazurile în care lipsește antigenul respectiv. Ei au următoarele caracteristici: aglutinează eritrocitele în suspensie salină, au efect hemolitic (inconstant) dependent de complement, sînt mai activi la temperatură scăzută (4°) decît la temperatura corpului, sînt rapid saturați de factori A sau B solubili (ca și cei din salivă) și sînt termolabili, efectul lor aglutinant dispărînd după o încălzire timp de 10′ la 70°C.

2) *Anticorpii imuni din sistemul ABO* prezintă unele caracteristici care îi deosebesc de anticorpii naturali (20) și anume: cauza apariției lor poate fi, de cele mai multe ori, stabilită, puterea lor aglutinantă este mai accentuată pe eritrocitele în suspensie albuminoasă decît pe cele în suspensie salină, sînt dotate cu putere hemolitică față de eri-

Scanned with OKEN Scanner

trocitele din grupele corespunzătoare (în prezența complementului), temperatura optimă pentru activitatea lor este mai ridicată și sînt termostabili, cel puțin pentru puterea aglutinantă (activitatea hemolizantă se distruge prin căldură). Anticorpii imuni din sistemul ABO pot apărea prin izo- sau heteroimunizare.

Izoimunizare interumană se poate produce prin sarcină incompatibilă și prin transfuzie de sînge incompatibil.

Heteroimunizarea constă în pătrunderea în organism a unor substanțe hidrosolubile de origine animală sau bacteriană, apropiate structural de factorii de grup sanguin A sau B. Modalitățile de apariție sînt: efectuarea de vaccinări (cu anatoxină antitetanică sau antidifterică, vaccin TAB), seroterapie și prin opoterapie (cu extracte animale bogate în factor A). Persistența anticorpilor imuni formați în astfel de cazuri este de la cîteva zile pînă la mai mulți ani.

2. SISTEMUL RHESUS (Rh)

Landsteiner și Wiener, în cadrul unor cercetări asupra factorilor sanguini comuni la om și la animale (1937 și 1940), au constatat că injectînd la iepuri eritrocite de la maimuța *Macaccus Rhesus* se obține un ser care precipită nu numai eritrocitele acestui animal, ci și eritrocitele a 85% din indivizii umani de rasă albă luați la întîmplare. Persoanele care posedă factorul identic cu al maimuțelor Rhesus le-au numit Rhesus pozitive (sau, prescurtat Rh^+), iar cele 15% care sînt lipsite de acest factor, Rhesus negative (sau Rh^-).

Descoperirea acestui factor are o importanță considerabilă, întrucît persoanele Rh^- care, deși nu au în mod natural aglutinine împotriva factorului absent, pot dezvolta astfel de anticorpi în urma unei izoimunizări cu consecințe patologice severe. Izoimunizarea anti Rh poate apărea în următoarele eventualități:

— *transfuzia de sînge* Rh^+ efectuată unei persoane Rh^- bine tolerată la început, sensibilizează ulterior bolnavul stimulînd formarea anticorpilor anti Rh, încît la transfuziile următoare pot apărea accidente hemolitice, adesea foarte grave;

— *sarcina incompatibilă în sistemul Rh;* o sarcină cu făt Rh^+ la o femeie Rh^- stimulează (ca și transfuziile de sînge Rh^+) formarea anticorpilor anti-Rh la mamă; aceștia trec în circulația fătului și se fixează pe eritrocitele acestuia determinînd boala hemolitică a nou-născutului. (vezi și fig. 7-41).

Curînd după descoperirea lui Landsteiner și Wiener, s-a constatat că, spre deosebire de serul anti Rh, obținut prin imunizare cu eritrocite de Macaccus Rhesus, care au o singură specificitate, anticorpii de la bolnavii izoimunizați anti-Rh erau de specificități diferite, aglutinînd uneori eritrocitele Rh negative sau, în alte cazuri, nereacționînd cu eritrocite Rh pozitive. S-au descoperit apoi și cazuri de izoimunizare între indivizii Rh pozitivi sau Rh negativi. Aceste constatări au arătat că sistemul Rh, nu

Scanned with OKEN Scanner

constă dintr-un singur factor, ci este alcătuit dintr-un „mozaicism" antigenic. Primul factor omolog dar neidentic a fost numit factor C, iar următorul factor, E (factorul D fiind rezervat factorului Rh clasic). „Dezmembrarea" factorului Rh a ridicat unele controverse în legătură cu alcătuirea genică (fig. 3—22).

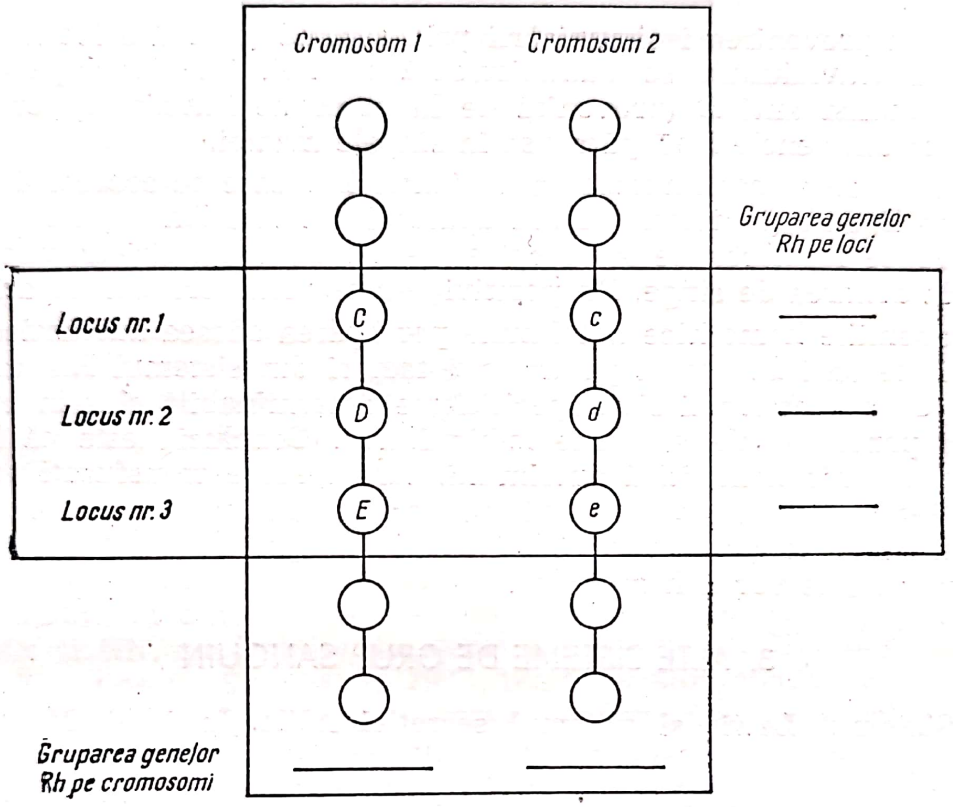


Fig. 3-22. Gruparea genelor Rh pe cromozomi şi pe loci (după Ortho, 1965).

Teoretic există două căi de grupare a genelor Rh: 1) cele două gene care ocupă acelaşi locus pot fi grupate împreună şi 2) cele trei gene, care ocupă acelaşi cromozom pot fi, de asemenea, grupate împreună.

Din combinarea diferită a celor 3 perechi de alele principale rezultă 36 genotipuri (şi fenotipuri) posibile, a căror frecvenţă în populaţie este foarte variată (între 41% şi mult sub 1‰). Genele situate pe acelaşi cromozom se transmit împreună. Astfel, un individ al cărui genotip este CDe/cde va transmite descendenţilor fie CDe, fie cde, deci dacă va transmite, de exemplu, C, va transmite odată cu el şi D şi e.

Un individ poate fi homo- sau heterozigot pentru un anumit caracter, după cum pe locusurile omologe se află aceeaşi alelă sau alele diferite. De exemplu, un individ Rh (D) pozitiv poate fi homozigot sau heterozigot; în primul caz caracterul D se transmite tuturor copiilor, pe cînd în al doilea caz, copiii pot fi Rh (D) pozitivi, sau negativi. Stabilirea genotipurilor Rh (paralel cu acelea din sistemul A B O şi NN Ss) au mare importanţă în medicina legală pentru expertizele de excludere a paternităţii.

Importanţa în clinică a sistemului Rh este deosebită; ea se leagă de izoimunizarea prin transfuzie sau sarcină, în majoritatea cazurilor faţă de factorul D. Imunoglobulinele utilizate în practică în ţara noastră

Scanned with OKEN Scanner

sînt specifice anti D (Rh O). Ele sînt fracţiuni purificate provenite din sîngele donatorilor în prealabil imunizaţi prin izoimunizare transfuzională şi obstetricală. Produsul furnizat de Centrul de hematologie şi transfuzii din Bucureşti are o concentraţie de 10%. Imunizarea în sistemul Rh se poate produce şi faţă de ceilalţi factori, pe locul al doilea urmînd factorul c.

Pentru prevenirea izoimunizării prin sarcină (care are loc în special în cursul travaliului), se administrează mamei, imediat după naştere, imunoglobulină anti D (provenită de la persoane imunizate), cu scopul de a bloca antigenele Rh^+ pătrunse în sîngele mamei.

Este de remarcat importanţa variantei D^u, care se comportă serologic ca un D slab (individul putînd apărea la testare Rh (D) negativ, dar poate induce formarea de anticorpi anti-D. Aceşti indivizi trebuie consideraţi, la donarea de sînge, Rh pozitivi, iar ca primitori, Rh negativi.

În anemiile hemolitice autoimune pot apărea adesea autoanticorpi cu specificitate anti D, dar şi pentru alţi factori din sistemul Rh (mai ales anti e). Chiar anticorpii fără specificitate determinabilă sînt în realitate specifici pentru unele antigene „ubiguitare". Concluzia este că la bolnavii cu anemie hemolitică autoimună care trebuie transfuzaţi este necesară determinarea specificităţii anticorpilor (după elecţia lor de pe eritrocite), sîngele administrat trebuind să fie lipsit de factorul respectiv, altfel eritrocitele vor fi hemolizate.

3. ALTE SISTEME DE GRUP SANGUIN

a. **Sistemul Lewis şi sistemul secreţiei ABH.** În 1946 Mourand a descoperit în sîngele a două femei spitalizate pentru naştere, o aglutinină iregulară pe care a numit-o aglutinina anti-Lewis (anti-Le). Făcînd testări în masă cu acest ser a constatat, în populaţia respectivă, o proporţie de 25% din indivizi Le pozitivi, Le (a^+), restul fiind Le negativi sau Le (a^-). În 1948 Andersen descoperă un nou factor pe care l-a numit Lewis b şi a constatat că toţi indivizii Le (a^+) sînt Le (b^-), iar dintre indivizii Le (a^-), 90% erau Le (b^+), restul de 10% fiind Le (a^-b^-); există deci o excludere mutuală între aceşti doi factori.

Grub a observat anumite corelaţii între fenotipul Lewis, sistemul ABO şi caracterul de secretor sau nesecretor de substanţe ABH. Se ştie că substanţele, ABH nu sînt prezente exclusiv pe eritrocite şi că la 80% din indivizii de rasă albă acestea se găsesc dizolvate în diferite lichide de secreţie, mai uşor abordabile în salivă. Acest caracter este determinat de sistemul de gene Se se, alela Se (în doză simplă sau dublă) conferind calitatea de „secretor", iar alela se (recesivă) în forma homozigotă — pe aceea de „nesecretor". În ce priveşte relaţia dintre acest sistem şi factorii din sistemul Lewis, Grub a arătat că:

— indivizii Le (a+b—) sînt secretori pentru ABH;
— indivizii Le (a—b+) sînt nesecretori pentru ABH;
— indivizii Le (a—b—) sînt atît secretori cît şi nesecretori pentru ABH (în proporţie de 3/4 secretori şi 1/4 nesecretori).

Scanned with OKEN Scanner

Sînt şi alte constatări care contribuie la descifrarea naturii acestui sistem de antigene eritrocitare, cele mai importante fiind scăderea factorului Lewis în raport cu vîrsta (de la 80% indivizi Le (a+) la naştere, se ajunge la 20% la adulţi) şi diferenţele între cantităţile de factori Le (a) şi Le (b) în secreţii faţă de cele din eritrocite.

Grub conchide că sistemul Lewis nu trebuie considerat ca un sistem de grup sanguin eritrocitar, ci ca un sistem de factori hidrosolubili, controlat genetic, prezenţa lor pe eritrocite nefiind decît secundară şi accesorie. Prin spălarea repetată a eritrocitelor Le (a+) acestea ar deveni neaglutinabile cu anticorpi anti Le (a+); concluzia ar fi că factorul Lewis nu intră în structura chimică a stromei eritrocitare, ci ar fi doar fixat la suprafaţa eritrocitelor prin legături slabe, în cadrul circulaţiei lui plasmatice (20).

b. **Sistemul MNSe.** Acest sistem este reprezentat de două cupluri de gene legate între ele: M, N şi S, s, realizînd mai multe tipuri posibile de combinaţii: MNS, Ms, Ns etc.

1) *Factorii M şi N.* În 1927 Landsteiner şi Levine vrînd să obţină ser antiuman specific, au injectat iepurilor eritrocite de om de grup O. Lucrînd pe un număr mare de animale şi cu eritrocite de la numeroşi donatori, au constatat că unele imuno-seruri prezentau, în afară de specificitatea generală antiumană, o specificitate necunoscută pînă atunci (factorul M), iar mai tîrziu alta (factorul N).

S-a stabilit că cei doi factori corespund genetic la două alele cu caracter dominant, din combinarea cărora rezultă trei genotipuri posibile: MM, MN şi NN, cu fenotipurile corespunzătoare: M, MN şi N.

2) *Factorii S şi s.* În 1947, Walah şi Montgomery au descoperit la o femeie care a prezentat un accident obstetrical grav prin anticorpi anti Rh, o asociere a unui alt antigen, necunoscut pînă atunci, pe care l-au numit factor S. Testînd un număr mare de persoane, autorii au constatat că acest factor este legat de sistemul MN. Sistemele M, N şi S, s sînt genetic independente, dar aparţin aceluiaşi grup ligatural (segregă împreună). Factorul S se găseşte la 73% din indivizii MN, la 54% din indivizii M şi la 32% din indivizii N.

Importanţa practică a sistemului MNS constă, mai ales, în aportul pe care îl aduce în medicina legală la expertiza de excludere a paternităţii; mai rar poate da reacţii transfuzionale prin izoimunizare.

c. **Sistemul P-Tj (a)**

1) *Factorul P.* Landsteiner şi Levine au descoperit în serul iepurilor imunizaţi cu eritrocite de om, un anticorp pe care l-au numit anti P, capabil să „recunoască" un factor eritrocitar simbolizat prin această literă. Factorul P se transmite ca un caracter mendelian simplu dominant, ceea ce presupune existenţa a două gene: gena dominantă P care determină formarea factorului P şi gena p, recesivă, fără acţiune asupra acestei sinteze. Indivizii P+ sînt homo- sau heterozigoţi pentru P, pe cînd indivizii P— sînt totdeauna homozigoţi pentru p (20). După părerea lui Race şi Sanger, în sistemul P există constant anticorpi naturali, ca în sistemul ABO, cu putere hemolitică mai mare decît ai acestuia, însă faptul că aceşti anticorpi sînt inactivi la 37° le limitează interesul în le-

Scanned with OKEN Scanner

gătură cu transfuziile (99). Cu toate că antigenul nu este nociv în transfuzii, sistemul P deține un anumit rol în transplantare.

2) *Factorul Tj (a) sau factorul Jay.* În 1951 Levine descoperă la o bolnavă de grupa O, Rh^+ un anticorp de tip imun, activ asupra eritrocitelor a 3 000 de indivizi testați. Singure eritrocitele bolnavei și a surorii ei nu aglutinau sub efectul acestui nou anticorp pe care autorul l-a numit anti Jay sau anti Tj (a) (20). Acest factor atît de răspîndit, care este un antigen „public", ar fi dat naștere, prin mutație, factorului Tj (b), recesiv față de Tj (a), care la homozigoții (Tj (a)/Tj (b)) se manifestă ca genotip Tj (a). Absența antigenului Tj (a) se însoțește de apariția naturală în ser a anticorpului anti Tj (a); acești indivizi sînt foarte greu de transfuzat. Cum antigenul Tj (a) cunoaște o răspîndire aproape universală, indivizii Tj (a—) care sînt extrem de rari (circa 15 cazuri cunoscute) nu pot fi transfuzați decît între ei prin colaborare internațională.

d. **Sistemul Kell—Cellano.** După sistemul ABO și Rh sistemul Kell prezintă interesul practic cel mai mare în legătură cu posibilitățile de izoimunizare, care se poate solda cu accidente transfuzionale sau cu boală hemolitică a nou-născutului.

În 1946 Coombs, Mourant și Race au descoperit la o femeie (cu numele Kellacher), care a prezentat o izoimunizare obstetricală, o aglutinină neregulară de tip blocant; ea corespundea unui factor (notat cu majuscula K), prezent la circa 10% din indivizii de rasă albă și care se transmite ca un caracter mendelian simplu dominant. Fenotipul Kell (+) corespunde genotipului KK (0,5%) sau Kk (9,5%), iar fenotipul Kell (—) corespunde genotipului kk (90%).

În 1949 Levine și colab. au descris la o femeie (cu numele Cellano) o boală hemolitică neonatală indusă printr-un factor pînă atunci necunoscut; studiat la 2 500 de indivizi, acest factor a fost găsit absent doar la 5 (adică la 0,2%). Studii ulterioare au arătat o interdependență între factorul Kell și Cellano în sensul că toți inidivizii Cellano negativi sînt Kell pozitivi și invers.

Ulterior au fost descrise, tot în cadrul acestui sistem, factorii Fenny și Rautemberg, precum și fenotipurile Peltz și Max Leod. În 1958 a fost descoperit și factorul Sutter, care are o importanță antropologică deosebită, întrucît se întîlnește numai la negri și la negroizi; nu a fost întîlnit niciodată la rasa galbenă sau la pieile roșii și doar excepțional la albi (în aceste cazuri se presupune existența unui metisaj îndepărtat). Antigenul se înscrie cu inițialele Js^a; alela acesteia este Js^h sau factorul Matthews.

e. **Sistemul Duffy.** În 1950 Cutbush și colab. au descoperit, la un hemofilic politransfuzat, un anticorp iregular răspunzător de o puternică reacție hemolitică. Acest factor a fost numit (după numele bolnavului) anticorp anti-Duffy. Gena a fost notată cu semnele Fy^a, iar alela ei, cu Fy^b. O altă alelă (Fy) are o răspîndire foarte diferită la negrii (peste 80%) față de europeni (3%).

f. **Sistemul Kidd.** În 1951 Allen și colab. au descris în sîngele unei bolnave (cu numele de Kidd), care a născut un copil cu o boală hemoli-

Scanned with OKEN Scanner

tică neonatală, anticorpi cu specificitate pentru doi factori care au fost notaţi cu Jk^a şi Jk^b. Primul factor este prezent la circa 77% din populaţia albă. El se transmite autosomal dominant, fiind exprimat atît în stare homo-, cît şi heterozigotă.

g. **Sistemul Lutheran.** În 1945 Callender, Race şi Paykod au identificat în serul unui politransfuzat o aglutinină, necunoscută pînă atunci, pe care au numit-o anti-Lutheran, iar antigenul corespunzător, factor Lutheran. Autorii au demonstrat că factorul se transmite ca un factor mendelian simplu autosomal dominant. Sistemul Lutheran este format din doi factori alelici, Lu (a) şi Lu (b), ambii cu caracter codominant. În relaţie cu acest sistem pare să fie *sistemul Auberger,* descoperit de Salmon şi colab. în 1961 la un bolnav politransfuzat. Acest antigen este prezent la 82% din populaţie; cele 3 familii cunoscute în lume ca fiind Lu (a—b—) sînt şi Au (a—).

h. **Sistemul Diego.** În 1955 Leyrisse şi colab. au descoperit în Caracas, la o femeie care prezenta accidente de izoimunizare obstetricală, un anticorp imun, corespunzător unui antigen necunoscut pînă atunci, care se transmite ca un factor mendelian simplu dominant. Autorii propun un model cu două alele notate cu Di^a şi cu Di (genă mută). Acest sistem are o mare importanţă antropologică, deoarece nu se întîlneşte decît la populaţiile mongoloide, după cum antigenele Sutter din sistemul Kell aparţin rasei negre. Sistemul se întîlneşte într-o proporţie de aproape 50% la anumite triburi de Piei Roşii din Brazilia şi în proporţii mai reduse la japonezi, coreeni şi chinezi. Factorul Diego are o antigenicitate mare încît poate fi răspunzător pentru cazuri de boală hemolitică a nou-născutului.

i. **„Sistemul" I-i.** Denumirea de sistem I-i a fost trecută în ghilimele deoarece se aplică cu unele rezerve la aceste antigene, care se deosebesc prin anumite particularităţi de antigenele altor sisteme. Astfel:

— factorul i este prezent la naştere în cantitate masivă pe eritrocitele tuturor nou-născuţilor, apărînd deci ca un antigen public;

— în cursul primelor 18 luni de viaţă el este înlocuit progresiv cu factorul I, care apare ca un „antigen întîrziat", între cele două antigene există deci o relaţie inversă; factorul i pare să fie un precursor al lui I, a cărui transformare nu este însă niciodată completă;

— un mic număr din populaţia adultă (5 din 20 000 din determinările făcute de Wiener) păstrează antigenul i, în viaţă adultă;

— atît rarii indivizi de fenotip i, cît şi nou-născuţii, au însă pe eritrocitele lor o oarecare cantitate de factor I, astfel că nu există persoane I— în grad absolut;

— aglutininele anti-I apar adesea ca auto-anticorpi într-un anumit număr de cazuri patologice, mai ales în hemopatii.

j. **Sistemul Xg** a fost descoperit în 1961 de Mann, Cahan şi colab. la un bolnav politransfuzat. Importanţa lui este deosebit de mare din punct de vedere biologic deoarece, spre deosebire de celelalte sisteme antigenice ale eritrocitului, care sînt localizate pe cromozomi autosomali, sistemul Xg este sub controlul unui locus situat pe cromozomul X. Asupra localizării lui pe un heterosom a atras atenţia faptul că antigenul este

Scanned with OKEN Scanner

prezent, într-o proporţie de circa 62% la bărbaţi şi de 90% la femei. Antigenul Xg activ a fost notat cu Xg (a), iar gena corespunzătoare — cu Xg^a; aceasta posedă o alelă Xg considerată ca inactivă („mută").

III. ERITROCITUL PATOLOGIC

Anomaliile morfologice şi funcţionale ale eritrocitului rezultă din perturbările structurale şi metabolice localizate la nivelul membranei, a hemoglobinei sau a enzimelor; acestea pot fi alterate sau insuficiente cantitativ (28).

Anomaliile morfologice ale eritrocitelor se decelează în practică aproape exclusiv cu ajutorul hemogramei. Acest examen „banal" poate spune foarte mult dacă i se acordă atenţia cuvenită.

A. MODIFICĂRI DIMENSIONALE ŞI MORFOLOGICE

Abaterile de la morfologia eritrocitară clasică pot fi grupate, pe de o parte, în variaţii de mărime, formă şi culoare, iar pe de altă parte, în prezenţa în eritrocite a diverse incluzii cu provenienţă şi semnificaţie diferită (3, 61 a, 66, 178, 317).

1. VARIAŢII DE MĂRIME

Mijloace de determinare. Curba Price-Jones. De cele mai multe ori aprecierea mărimii eritrocitare poate fi făcută bine de către examinatorul experimentat, chiar la o inspecţie obişnuită a frotiului; una din condiţiile pentru aceasta este folosirea constantă a aceleiaşi combinaţii de lentile (ocular+obiectiv). Determinarea cu exactitate a variaţiilor de mărime eritrocitară (procentual pe clase de mărimi) se face cu ajutorul micrometrelor. Acestea sînt lentile plane pe care este gravată o linie gradată; ele se introduc în ocularul microscopului.

Metoda preconizată de Price-Jones prevede înscrierea pe un sistem de coordonate a valorilor obţinute prin determinarea diametrului unui număr cît mai mare de elemente (253). Această metodă a adus, pe timpuri, o contribuţie importantă la fundamentarea morfologiei eritrocitare normale şi patologice. Ea se utilizează astăzi în mod excepţional în practica curentă din cauză că cere prea mult timp, iar informaţiile pe care le oferă pot fi înlocuite avantajos cu cele obţinute prin alte metode, mai ales prin determinarea volumului eritrocitar mediu (VEM). Aspectul normal al curbei Price-Jones este acela al unui turn central ascuţit flancat de alte două turle laterale mai mici. În mod normal, aria centrală cuprinde 60—70% din totalitatea eritrocitelor, iar în ariile laterale cîte

15—20% de fiecare parte. După variațiile diametrului eritrocitar, aspectul curbei poate suferi modificări după cum urmează:

— *deviere la stînga*, de exemplu, în anemiile feriprive (microcitoză reală) sau în boala Minkowski-Chauffard (microsferocitoză ereditară);

— *deviere la dreapta*, care poate fi extremă, ca în anemia Biermer (megalocitoză) sau moderată (macrocitoză), ca în ciroze sau la nou-născut, în primele două săptămîni după naștere;

— *curbă bifazică*, de exemplu, cu unul din vîrfuri situat la stînga și altul în zona normală (situație ce poate apărea după transfuzii masive și repetate la bolnavii cu microsferocitoză ereditară sau cu anemie feriprivă), sau curbă bifazică cu unul din vîrfuri aflat la dreapta și altul în zona normală (boala Biermer transfuzată);

— *curba largă de implantare* apare în anizocitozele secundare anemiilor grave; în aceste împrejurări diametrul eritrocitar poate să varieze între 5 și 10 μ sau chiar mai mult, de exemplu în talasemia majoră, boala Biermer etc. Dacă se iau în considerare schizocitele (2—3 μ) și gigantecitele (15—20 μ), frecvente în megaloblastoză și talasemie, putem avea curbe scunde și extrem de largi.

Cînd anizocitoza este însoțită de poikilocitoză și de variații de culoare (policromatofilie), ea poate fi expresia unei regenerări medulare intense (108, 143, 228).

a. **Microcitele** sînt eritrocite mature ale cărui dimensiuni sînt sub valorile normale. Există și o microcitoză fiziologică, dar aceasta nu depășește 20% din totalul elementelor, iar dimensiunile eritrocitare nu scad cu mai mult de 1—1,5 μ sub cele ale valorii normale medii. În microcitozele patologice peste 1/4 din totalul eritrocitelor au un diametru mai mic (circa 5—6 μ), o grosime medie de circa 1,5 μ, un volum de 60—80 μ^3 sau mai puțin și o suprafață de 100—120 μ^2. Încărcarea microcitului cu hemoglobină este redusă, nu numai din cauza volumului său scăzut ci, de cele mai multe ori, din cauza încărcării subnormale cu acest pigment. Microcitul apare pe frotiu, adesea, cu o zonă mai clară în mijloc, iar cînd aceasta este foarte pronunțată, el devine anulocit.

Microcitoza este una din caracteristicile anemiilor hipocrome. Ea mai poate fi întîlnită și în unele tipuri speciale de poliglobulii, de exemplu în talasemia minoră, în care excesul de eritrocite compensează încărcarea lor scăzută cu hemoglobină.

b. **Macrocitele** sînt eritrocite mature ale căror dimensiuni se situează peste valorile normale. În macrocitoza fiziologică acestea nu depășesc 20% din totalul eritrocitelor. Macrocitoza ca atare nu se însoțește de modificări calitative pronunțate, toate dimensiunile eritrocitare fiind mărite proporțional; diametrul la 8—10 μ, grosimea medie la circa 2,2 μ, volumul eritrocitar poate depăși 100 μ^3, iar încărcarea cu hemoglobină poate fi mai mare de 35 μμg/E; raportul dintre grosimea eritrocitului și diametrul lui este nemodificat față de normal. Pe frotiul sanguin macrocitele apar mai intens colorate, uneori cu dispariția zonei mai clare din centru. Ele coexistă cu eritrocitele normale.

Macrocitoza fiziologică apare la nou-născut în primele două săptămîni de viață, alături de o anizocitoză importantă. Macrocitoza patologică

Scanned with OKEN Scanner

apare în toate stările însoțite de creșteri importante ale numărului de reticulocite. În afară de macrocitoza din reticulocitoze, se descrie o macrocitoză adevărată, urmare unei tulburări a mecanismului de proliferare a eritrocitelor, frecvent întîlnită în cazurile de insuficiență hepatică.

c. **Megalocitele** sînt eritrocite mature de talie foarte mare, cu semnificație totdeauna patologică; dimensiunile lor depășesc cu mult pe cele normale (diametru de 12—15 μ, volum pînă la 120—140 μ^3, grosime medie de 2,5 μ). Pe frotiu apar adesea de formă eliptică, diametrul mare putînd depăși uneori dublul diametrul eritrocitului normal, iar diametrul mic fiind apropiat de valorile normale. Megalocitele nu prezintă zona clară centrală, apărînd astfel colorate omogen, mai intens decît eritrocitele obișnuite; încărcarea cu hemoglobină nu depășește nici aici 1/3 din volumul celular.

Megalocitul rezultă dintr-o alterare profundă a procesului de proliferare. Diferențierea megalocitelor de macrocite întîmpină uneori dificultăți în formele incipiente de boală Biermer. În formele avansate diferențierea se face după criteriul dimensional. Cel mai sigur mijloc de diagnostic în această boală este puncția sternală, care pune în evidență prezența megaloblaștilor care pot apărea uneori și în sîngele periferic.

d. **Schizocitele** nu sînt propriu-zis eritrocite ci fragmente ale acestora, cu un diametru de 2—4 μ, de formă rotundă sau neregulată, fără formă biconcavă, multe din ele sînt hipocrome.

Unii autori numesc schizocite doar fragmentele deformate (cele rotunde fiind „microciclocite"), alții le numesc fragmentocite, pentru a sublinia faptul că nu provin dintr-o serie celulară specială. Dacă dintr-un eritrocit s-a desprins un fragment mic, unii îl numesc doar pe acesta schizociz, nu și eritrocitul „ciupit".

Mecanismele de producere a schizocitelor sînt multiple (61). Unele schizocite sînt fragmente de eritrocite patologice (poikilocite, megalocite, eritrocite „în șaibă" etc.); alteori ele pot proveni din eritrocitele normale prin fragmentare mecanică, de exemplu în cazul circulației extracorporeale sau a implantării de proteze valvulare sau, în cazul anemiilor microangiopatice, datorită filamentelor de fibrină formate pe pereții vasculari (fig. 3-23 și fig. 3-26, 7-15 etc.).

Alte ori schizocitele circulante sînt consecința fagocitării parțiale a eritrocitelor, fragmentul rămas luînd o formă sferică sub care circulă în continuare în sînge. Durata de viață a schizocitelor este scurtă (cîteva ore pentru fragmentele de eritrocit fagocitat), iar capacitatea lor funcțională este de asemenea redusă (vezi și fig. 7-6).

Interpretarea modificărilor de mărime eritrocitară. Criteriul dimensiunilor eritrocitare stă și astăzi la baza a numeroase clasificări a anemiilor (macro-, normo- și microcitare) la fel cu criteriul numărului de eritrocite (anemii ușoare, medii, severe); clasificarea după dimensiuni are însă corespondențe etiopatogenice incontestabile. Anizocitoza apare, în general, însoțită de alte tulburări morfologice (formă, culoare, incluzii etc.). Unele din afecțiunile care pot fi sugerate de modificările dimensionale sînt arătate în fig. 3—24.

Scanned with OKEN Scanner

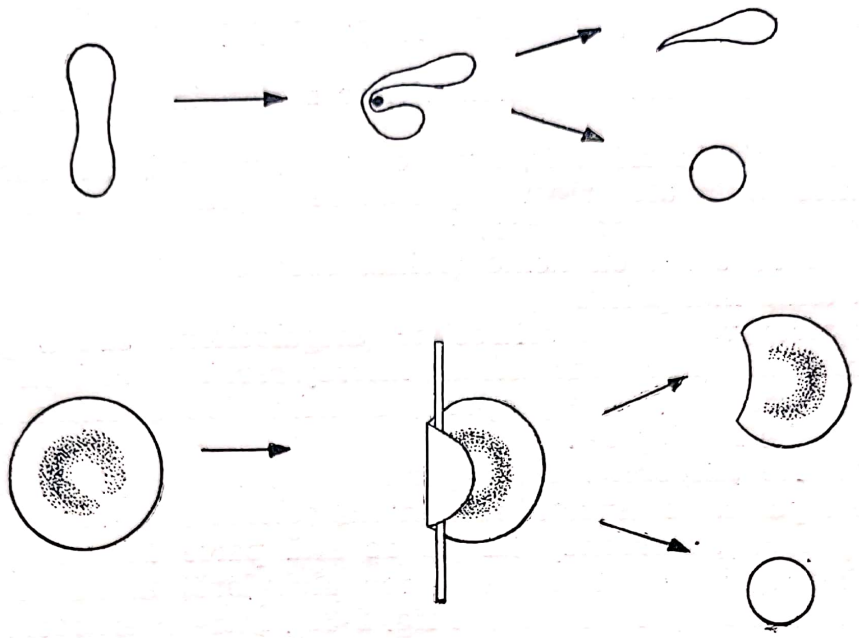


Fig. 3-23. Producerea de schizocite prin secționarea eritrocitului de către un fir de fibrină; unul din cele două fragmente „retezate" devine schizocit, iar celălalt, eritrocit ciupit (după M. Bessis, 1973).

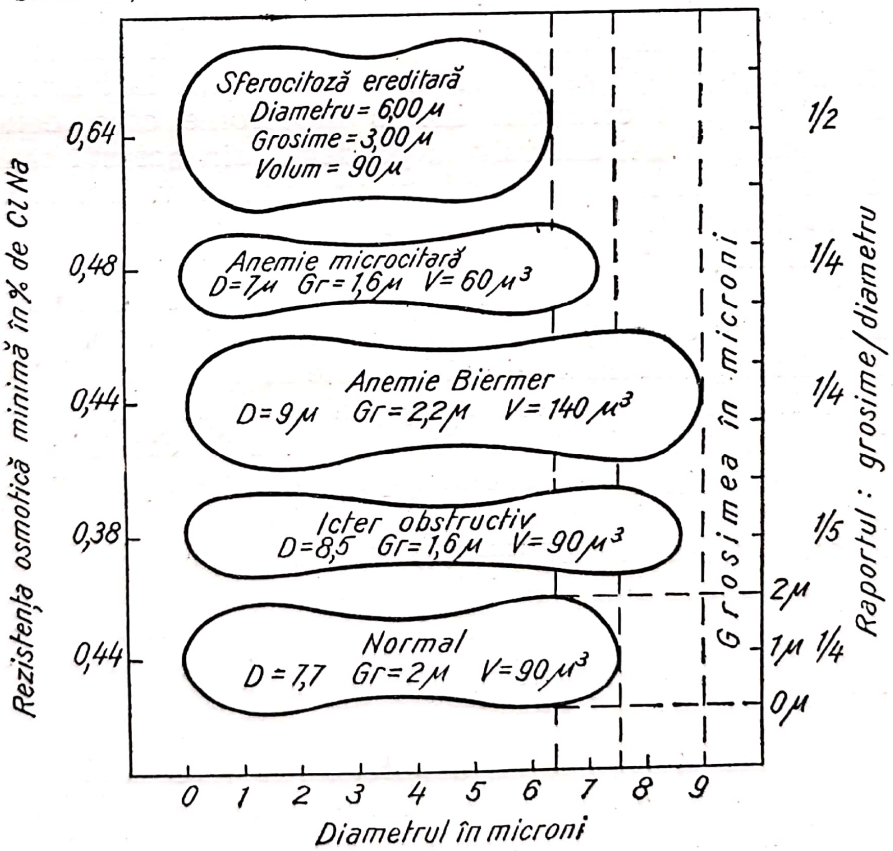


Fig. 3-24. Diametrul, grosimea medie și volumul eritrocitar în diferite stări normale și patologice (după Haden).

Pe abscisă sînt trecute diametrele eritrocitelor, pe ordonata din dreapta, raportul dintre grosime și diametru (din care rezultă indicele de sfericitate), iar pe cea din stînga este indicată rezistența osmotică minimă a acestor eritrocite.

Scanned with OKEN Scanner

2. VARIAŢII DE CULOARE

Variaţiile de culoare ale eritrocitelor survin în următoarele împrejurări:

— persistenţa în eritrocit, după expulzia nucleului, a unor organite citoplasmatice (mai ales ribozomi) care le imprimă o tentă albăstruie, mai mult sau mai puţin accentuată;

— încărcare slabă cu hemoglobină, ceea ce face ca eritrocitele să apară cu o tentă mai palidă;

— creşterea volumului eritrocitar (megalocitoză) sau a grosimii, în dauna diametrului (microsferocitoză), împrejurări în care eritrocitele apar mai intens colorate (fără ca proporţia de hemoglobină eritrocitară să depăşească valorile fiziologice).

a. **Eritrocite „hipercrome".** Hipercromia este o noţiune falsă, generată, pe de o parte, de aspectul mai intens colorat al unor eritrocite (macrocite, megalocite, sferocite), iar pe de altă parte de rezultatul supraunitar al indicelui de culoare (valoarea globulară) în calcularea căruia nu intră volumul eritrocitar (vezi şi fig. 2-32). Într-un eritrocit, indiferent de volumul său, hemoglobina nu poate ocupa mai mult de 1/3, concentraţia hemoglobinei într-un eritrocit fiind aproape de pragul de saturare.

b. **Eritrocitele hipocrome** apar pe frotiu mai palide în comparaţie cu cele normale. Hipocromia este însoţită, de cele mai multe ori, de microcitoză, ca în anemiile hipocrome feriprive (ca şi cum volumul scăzut al eritrocitelor ar fi o adaptare la conţinutul lor redus în hemoglobină).

c. **Anulocitele** sînt eritrocite intens hipocrome care dau impresia concentrării hemoglobinei exclusiv la periferie, din această cauză centrul lor pare decolorat, celula semănînd cu un inel (cuv. lat. *anulus*=inel). Forma lor poate fi rotundă, ovală sau neregulată; de cele mai multe ori anulocitele sînt micro-platicite; grosimea lor centrală este de circa 1 μ.

Anulocitele se întîlnesc în anemiile feriprive, în talasemii, dar şi în anemii grave de alte cauze (neoplasme, leucemii acute etc.).

d. **Eritrocitele policromatofile şi bazofile** sînt eritrocite tinere la care nu s-a ajuns încă la maturarea completă a citoplasmei după expulzia nucleului; ele corespund deci cu reticulocitele. Culoarea lor pe frotiul colorat MGG este roz-albăstrie, roz-cenuşie sau roz-violetă, pentru eritrocitele policromatofile şi cu nuanţă net albăstruie pentru cele bazofile.

Prezenţa în număr redus (1—2%) a unor eritrocite cu tentă policromatofilă puţin accentuată, este fiziologică. Numărul lor mare sau tenta albastră mai pronunţată sînt indicii, fie ale unui efort de regenerare intensă (anemie hemolitică) sau ale unei tulburări a diabazei — (mieloscleroză) — fie un semn de tulburare a maturaţiei citoplasmatice (plumbism).

e. **Acromocitele şi acromoreticulocitele.** Acromoreticulocitele sînt reticulocite tinere cu o foarte slabă încărcare cu hemoglobină apărînd, din această cauză, mult mai palid colorate, asemenea unor umbre sau fantome eritrocitare. Spre deosebire de reticulocite, care provin din eritroblaştii oxifili, acromoreticulocitele provin din eritroblaştii policromatofili sau chiar bazofili, care şi-au expulzat de timpuriu nucleul, înainte de a

Scanned with OKEN Scanner

se fi încărcat suficient cu hemoglobină, iar echipamentul citoplasmatic cu care au părăsit măduva (ARN-m etc.) nu este destul de bogat să permită o maturare completă a acesteia. Ca dimensiuni sînt mai mari, chiar decît reticulocitele (10—12 μ), iar rețeaua reticulo-filamentoasă este foarte netă la început. După maturarea lor în sîngele periferic ele devin acromocite (celule fără culoare), iar pe frotiu apar ca macrocite palide.

Creșterea lor în sîngele periferic are, în general, aceeași semnificație ca și aceea a reticulocitelor sau a precursorilor eritrocitari nucleați și traduc un efort de regenerare medulară în prezența unei tulburări de maturare eritrocitară.

f. **Anizocromia** se caracterizează prin prezența concomitentă a eritrocitelor normocrome alături de altele hipocrome, datorită încărcării lor inegale cu hemoglobină. Ea este, de asemenea, un indiciu de tulburare a eritropoiezei, fiind întîlnite în numeroase tipuri de anemii.

3. VARIAȚII DE FORMĂ

Eritrocitele pot prezenta modificări de formă în numeroase condiții experimentale și patologice. Ele țin mai ales de modificările structurii membranei eritrocitare, de modificările în cantitatea și calitatea hemoglobinei și de acțiunea unor factori din mediul ambiant.

a. **Eliptocitele** sînt eritrocite de formă ovală; diferența dintre cele două diametre este variabilă, dar relativ constantă la același individ (ex. 8/5 μ). Prezența unui număr redus de ovalocite a căror diferență între diametre este mică (1—15 μ) este fiziologică. Cînd numărul lor și diferența între diametre nu este prea pronunțat, se obișnuiește utilizarea termenului de eliptocitoză, iar cînd aspectul lor alungit este mai pronunțat se întrebuințează denumirea de bacteriocitoză. Eliptocitele în formă de ou se mai numesc ovalocite (*ovus*, cuv. lat. = ou).

Eritrocitele camelidelor (cămilă, dromader, lama) sînt de formă ovală, iar cele ale păsărilor și ale amfibiilor sînt tot ovale, dar în plus sînt și nucleate. Camelidele sînt supuse adesea timp îndelungat la lipsa de apă. Forma eritrocitelor influențează rezistența osmotică a ovalocitelor care este mai crescută, ele putînd rezista în soluții hipotone de 2 g‰ NaCl. La aceste animale ovalocitoza reprezintă un fenomen de adaptare la condițiile de viață din deșert unde se ajunge la deshidratări considerabile, condiții în care chiar și eritrocitele ajung să piardă pînă la 30% din greutatea lor. Ajuns la oază, dromaderul poate ingera în 10—15 minute peste 100 l de apă, refăcîndu-și în acest interval greutatea, rehidratarea recuperînd brusc și pierderile de apă din eritrocite (24).

Eritrocitele din eliptocitoza ereditară la om pot să aibă uneori o fragilitate mai mare decît eritrocitele normale; în marea majoritate a cazurilor aceasta este compensată de o hiperplazie medulară, cazurile însoțite de anemie hemolitică veritabilă sînt rare (sub 10%). Transmiterea tarei este dominantă prin cromozom somatic.

Hall S. Hansen, care a studiat măduva sternală a unor persoane purtătoare a acestei anomalii, a constatat că eritroblaștii nu au forma ovală; chiar reticulocitele sanguine apar rotunde, aspectul ovalar instalîndu-se după stadiul de reticulocit.

Ovalocitoza, prezentă la un număr mic de celule, este un fenomen fiziologic. Acest caracter este mai pronunțat în anemii, mai ales în cele macrocitare; în anemia Biermer proporția de celule ovalocitare poate

Scanned with OKEN Scanner

atinge 1/4 din totalul eritrocitelor. Alte eliptocitoze secundare pot fi întîlnite în anemiile carenţiale grave sau asociate infecţiilor, neoplasmelor etc. În unele teritorii (regiuni din Olanda, Germania, Italia), se întîlneşte un anumit grad de ovalocitoză la un procent destul de ridicat din populaţia generală (circa 0,5%) fără să se însoţească de alte semne patologice.

b. **Poikilocitele** reprezintă forme eritrocitare negeometrice, neclasificabile, fiecare eritrocit patologic avînd un aspect diferit, ceea ce face imposibilă determinarea diametrului lor mediu (cuv. gr. *poikilos* = variat) (fig. 3-25). Pe frotiu, poikilocitele apar sub formele cele mai bizare: de rachetă, pară, corn (keratocite), picătură, virgulă, şirul de asemănări pu-

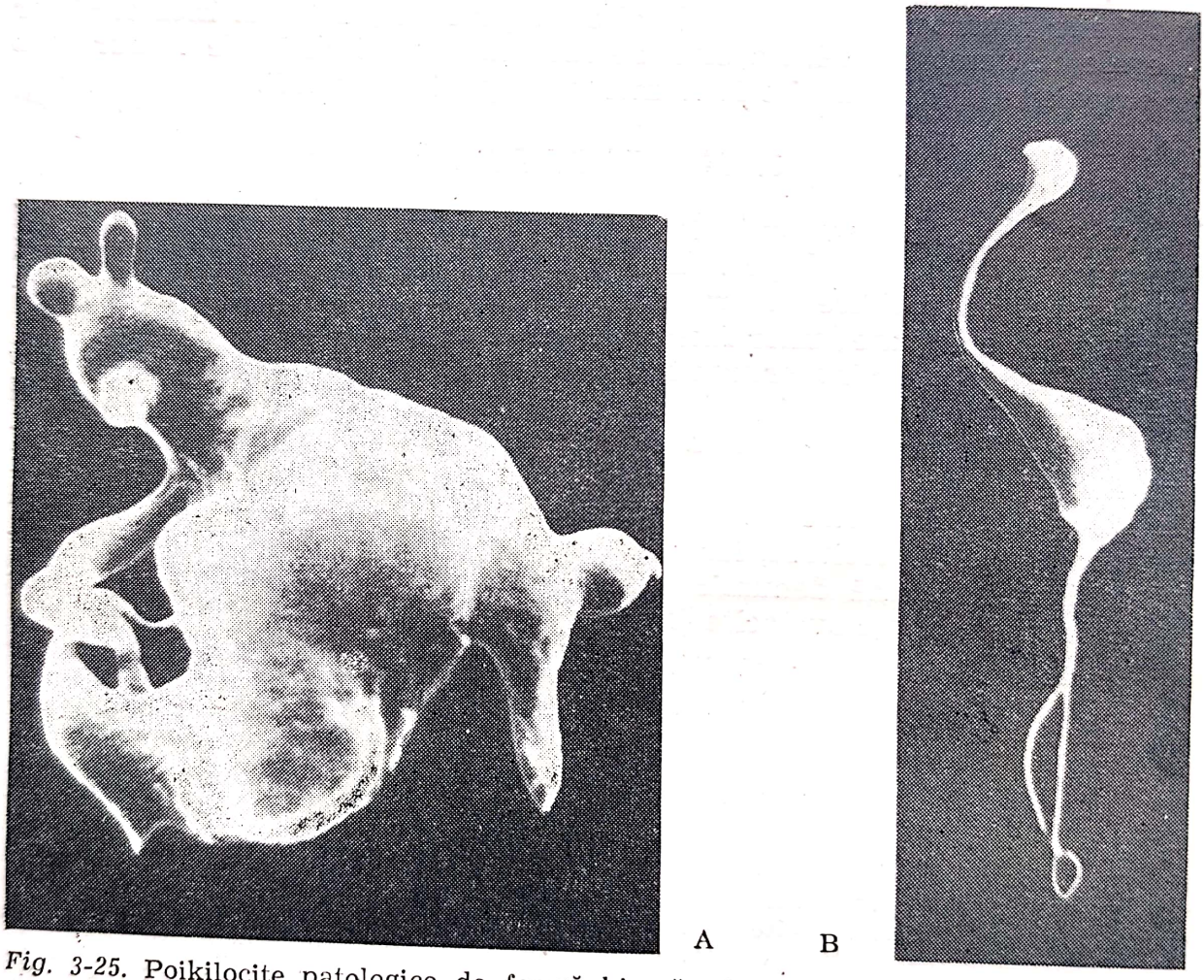


Fig. 3-25. Poikilocite patologice de formă bizară văzute tridimensional (stereoscan) (după G. Brecher, 1972).
A: poikilocit în formă de „cangur"; B: poikilocit în formă de „flamingo".

tînd fi continuat după imaginaţia examinatorului: în formă de lacrimă (dacriocite), clopot (codocite), măciucă etc. Ele au fragilitate crescută, aspectul deformat accentuîndu-se cu ocazia întinderii frotiului sanguin. Ele nu sînt însă artefacte de etalare întrucît sînt regăsite, în aceeaşi proporţie şi cu ocazia numărării eritrocitelor, cînd sînt suspendate într-o soluţie izotonică.

Scanned with OKEN Scanner

Poikilocitoza traduce o regenerare intensă și patologică a eritropoiezei. Poikilocitoza pronunțată (cantitativ și calitativ) se întîlnește în anemiile hemolitice grave, în anemiile carențiale severe (feriprive sau prin deficit de vitamină B_{12}), în anemiile din talasemie, mieloscleroză, leucemiile acute, neoplasme cașectizante, uremii etc. Eritropoieza extramedulară furnizează circulației un mare număr de poikilocite.

Poikilocitoza se însoțește de obicei și de anizocitoză și policromatofilie. Cînd predomină un anumit aspect de eritrocite se folosește adjectivul care le caracterizează mai mult (drepanocitoză, ovalocitoză, acantocitoză, eritrocite ciupite etc.) (5, 18, 158). Foarte frecvent se asociază, la același eritrocit, cîte două sau mai multe alterări morfologice putîndu-se întîlni sfero-echinocite, sfero-stomatocite, echino-acantocite, echino-elipticite, stomato-acantocite, drepano-echinocite etc.

c. **Eritrocitele „ciupite"** (knitocite). Spre deosebire de schizocite, care reprezintă fragmente dintr-un eritrocit, hematiile ciupite (knitocite) sînt eritrocite din care s-a desprins un fragment, sau care au fost „rănite" pe o zonă de dimensiuni variabile (cuv. gr. *knizein*= a ciupi) (fig. 3-26). Aceste eritrocite, cu un anumit grad de uzură prealabilă, au rezistat parțial la procesul de hemoliză mecanică sau chimică formîndu-și o zonă

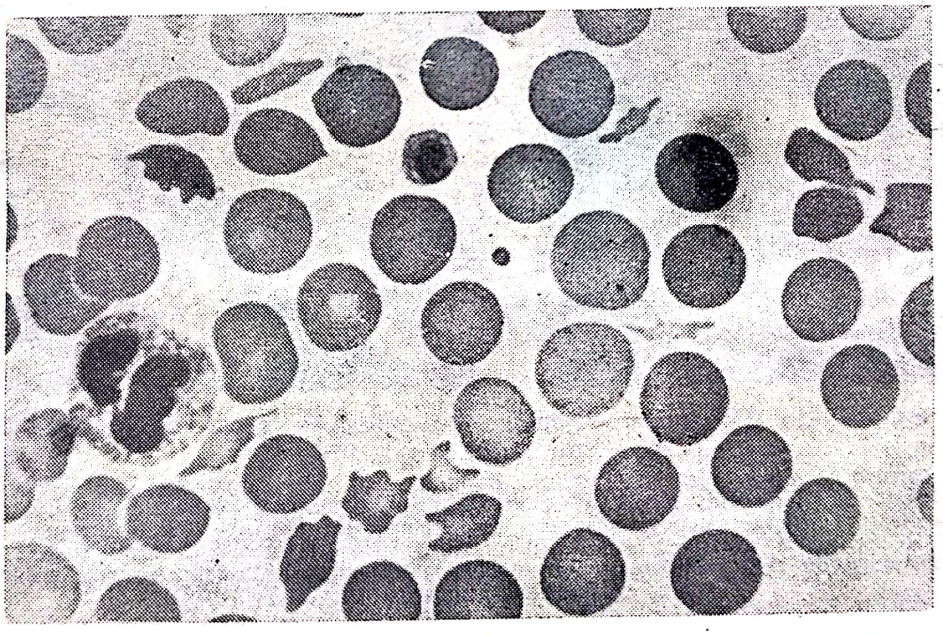


Fig. 3-26. Frotiu de sînge cu numeroase eritrocite „ciupite" sau în „coajă de ou" și schizocite sugerînd prezența unei hemolize mecanice (după P. Vernant și colab., 1971).

„cicatriceală" caracteristică. Aspectul lor este diferit, după tehnica cu care sînt cercetate: la microscopul optic apar adesea ca o lună în al doilea sau al treilea pătrar (selenocite), iar la stereoscan arată formele cele mai bizare. Uneori iau aspect bicorn (keratocite).

Eritrocitele „ciupite" apar, fie ca urmare a unei fragilități intrinseci (boală Biermer, hemoglobinoliză), fie în urma supunerii eritrocitelor

normale unor traumatisme puternice (proteze valvulare) sau unor deformări exagerate, ca în anemiile hemolitice microangiopatice în care vasele sînt, nu numai îngustate, ci și „rugoase" din cauza depozitării de fibrină pe pereții lor.

d. **Eritrocitele excavate** prezintă, de asemenea, o mare heterogenitate. Din cauza aspectelor bizare, autorii mai vechi le-au inclus în termenul generic de poikilocite; alți autori descriu însă în acest cadru diverse tipuri morfologice sub denumirile cele mai variate ca: eritrocite în farfurioară, în cupă, în coif, codocite (cuv. gr. *kodon*=clopot), stomatocite (cuv. gr. *stoma*=gură etc.). Stomatocitele de exemplu au primit această denumire din cauză că prezentau în centru o înfundare alungită sau rotundă în formă de gură (fig. 3-27 și fig. 3-28).

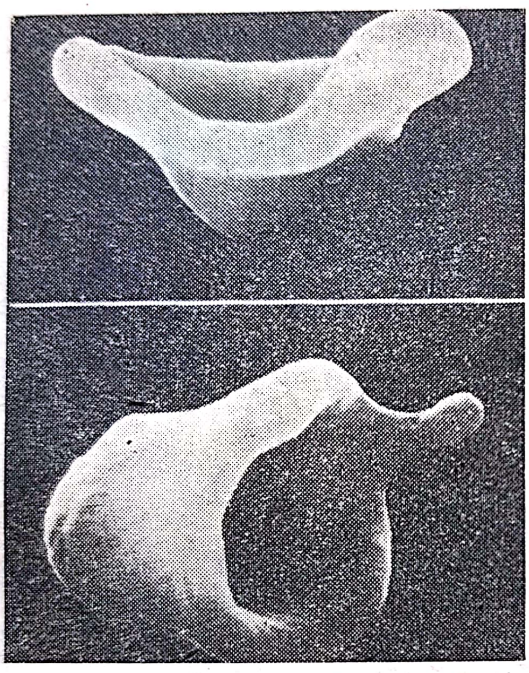


Fig. 3-27. Stînga: două forme particulare de eritrocite hipocrome (după M. Bessis și A. de Boisfleury, 1970).

Sus — în formă de cupă sau farfurioară (aspectul cel mai frecvent); *jos* — în formă de clopot (codocit) sau capișon, avînd și o prelungire în formă de mîner și un orificiu pe suprafața scobiturii interne, produs probabil de ruperea membranei care a acoperit o vacuolă superficială (care ar fi putut fi rezultatul acțiunii unor factori mecanici, toxici, metabolici sau o manifestare de senescență eritrocitară) (vezi în comparație figura următoare) (Talasemie; stereoscan, mărire de 12 000×).

Fig. 3-28. Dreapta: eritrocite „în cupă" examinate în secțiune la microscopul electronic. (După M. Bessis și A. de Boisfleury, 1970).

De notat prezența vacuolelor situate aproape de suprafață (Talasemie, mărire de 11 000×).

Aceste eritrocite pot fi găsite în numeroase anemii, mai ales hipocrome, în care existau și defecte intracorpusculare (ex. talasemie); au mai fost descrise diferite variante în intoxicații, cancere generalizate, hipertensiune arterială malignă etc. (fig. 3-29).

e. **Platicitele sau leptocitele** sînt eritrocite cu volum normal, dar cu diametrul longitudinal crescut și grosimea scăzută, ceea ce le conferă

Scanned with OKEN Scanner

un indice de sfericitate mai mare de 4,2. Forma discoidală este parţial păstrată, însă cele două concavităţi sînt mai puţin accentuate şi mai întinse, ceea ce face ca pe frotiu celulele să apară aproape uniform colorate. Cînd încărcarea cu hemoglobină este scăzută platicitele apar mai palide. Pentru explicarea platicitozei s-a emis părerea că s-ar datora unei disproporţii dintre cantitatea redusă a hemoglobinei şi volumul normal al stromei care s-ar adapta acestui conţinut redus.

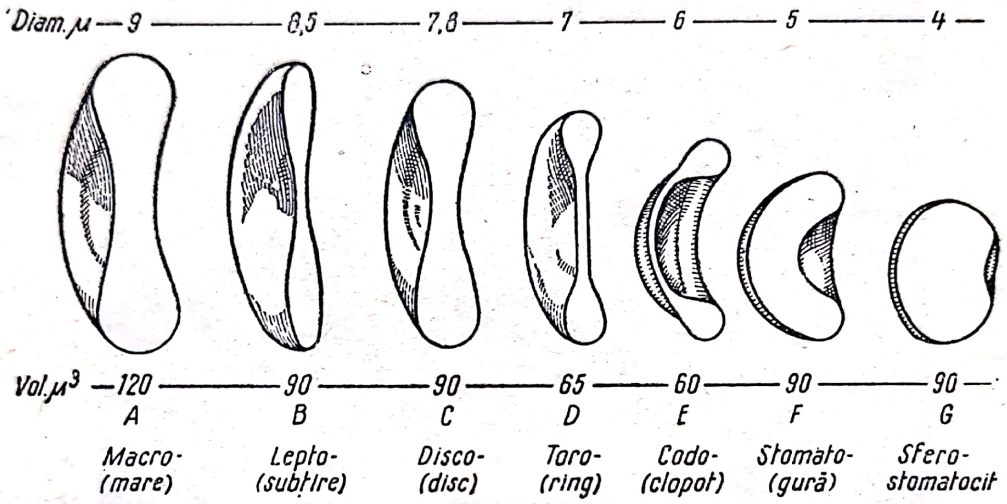


Fig. 3-29. Profile de eritrocite, după diametru şi volum, în diferite anemii (după M. Bessis, 1972).

A, anemie pernicioasă; B, icter obstructiv; C, stare normală; D, anemie hipocromă; E, talasemie; F, stomatocitoză; G, sferocitoză ereditară (vezi şi fig. 3-24).

Forma pură de platicitoză apare rar (unele talasemii). Platicitoza se asociază adesea, fie cu microcitoza (asemii feriprive), fie cu macrocitoza (icter prin obstrucţie, hepatite şi ciroze hepatice).

f. **Eritrocitele „în şaibă"** sau *„în semn de tras la ţintă"** (cuv. fr. *cible*=semn de tras la ţintă), numite încă şi eritrocite „în cocardă" sau în „pălărie mexicană" (sombrero), „target-cells" (cuv. engl. *target*=ţintă) etc. Ele sînt eritrocite patologice a căror membrană este ondulată (dispusă în falduri), ceea ce face ca pe frotiul de sînge periferic zona marginală şi cea centrală să apară colorate în roz, între ele interpunîndu-se o zonă intermediară mai clară (fig. 3—30). Ele apar ca şi cum ar avea un exces de membrană faţă de volumul lor. În interiorul lor au putut fi văzute uneori alinieri de molecule de hemoglobină agregate, precum şi cristale de Hb; aceste alterări le conferă o rigiditate ce îngreunează pasajul lor prin capilarele înguste; fragilitatea crescută a membranei reduce rezistenţa lor mecanică ducînd la apariţia unei senescenţe precoce.

* Cuvîntul francez *cible* derivă din cuv. german *Scheibe*=şaibă (garnitură inelară în jurul şurubului), cuvînt existent şi în vocabularul nostru; din această cauză considerăm mai potrivită nomenclatura de eritrocite „în şaibă" decît cea de hematie în „semn de tras la ţintă".

Eritrocitele „în șaibă“ se întîlnesc mai ales în talasemia majoră și în hemoglobinoza C, însă în număr mai mic și inconstant se întîlnesc în toate anemiile grave însoțite de hipocromie, precum și după splenectomie.

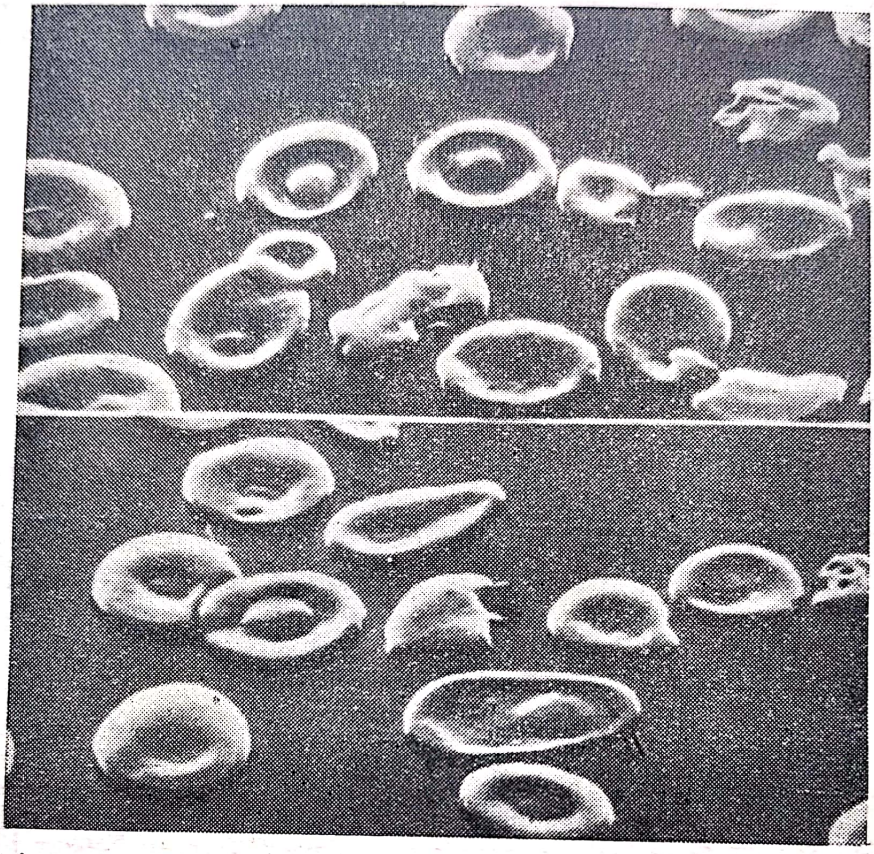


Fig. 3-30. Poikilocite văzute la stereoscan, la un bolnav cu talasemie; predomină eritrocitele „în șaibă“; se văd și cîteva anulocite și eritrocite ciupite (după M. Bessis și A. de Boisfleury, 1970).

g. **Sferocitele** sînt eritrocite cu volum normal, dar al căror diametru longitudinal scade în favoarea celui transversal, astfel că, deși diametrul lor nu depășește 6 μ, volumul se menține normal (anomalie inversă față de platicitoză). Pe frotiul sanguin ele apar mai intens colorate, lipsite de zona centrală clară. Din această cauză, cu toată încărcarea normală cu hemoglobină (sau, eventual, chiar subnormală) sferocitele par hipercrome. Prin dispariția zonelor concave centrale, suprafața lor se reduce cu 20—30% față de eritrocitele normale. Reducerea suprafeței eritrocitare, alături de menținerea unui volum constant, este dată și de pierderea de substanțe ce alcătuiesc membrana (mai ales colesterol). În sferocitoza ereditară anomalia de bază rezidă într-o alterare a unei proteine structurale, proteină elastică și contractilă numită *spectrină*, analoagă actinei musculare sau trombosteninei trombocitare, în urma căreia eritrocitele apar cu modificări ale proprietăților fizice fundamentale (formă, volum, elasticitate, încărcare electrică) (158 b).

Distincția dintre microcitoză și microsferocitoză nu trebuie făcută numai după aspectul morfologic, ci și prin calculul VEM și CHEM. Determinarea grosimii eritrocitare medii este o metodă mult mai puțin utilizată. Indicele de sfericitate, care reprezintă raportul diametru mediu/grosime medie, este sub 2,4 la sferocite, în timp ce în mod normal el este situat între 2,4—4,2.

Prezența sferocitelor este caracteristică în boala Minkovsky-Chauffard (microsferocitoza ereditară) unde numărul lor depășește 15—20%. În număr mai mic pot fi întîlnite în unele anemii hemolitice, mai ales de cauză extra-eritrocitară, ca urmare, în primul, rînd a acțiunii auto-anticorpilor antieritrocitari. Sferocitoza apare constant înaintea hemolizelor brutale (macrosferocitoză). În general, forma sferoidă este un stadiu premergător hemolizei (umflare prehemolitică). În stare normală, numărul sferocitelor nu depășește 1%.

Sferocitele sînt mult mai fragile în soluții hipotone decît eritrocitele normale. De asemenea, ele hemolizează mai rapid, chiar în plasma proprie; incubate la 37°C ele se lizează în mai puțin de 48 de ore, testul de autohemoliză Selvyn-Dacie se corectează însă prin adaos de glucoză.

h. **Acantocitele numite și echinocite*** sau **eritrocite crenelate** pot fi eritrocite normal structurate sau patologice (124). Eritrocitele normale, puse în mediu salin, apar ca echinocite, adică eritrocite purtătoare de spicule care dau conturului eritrocitar un aspect stelat (astrocit). Pe frotiul de sînge periferic ele iau forma unor roți dințate, iar văzute tridimensional au aspectul unor castane cu coajă. Dacă sîngele este întins pe lamă în strat gros, apare adesea aspectul de eritrocite crenelate, din cauză că, eritrocitele pierzînd lent apa prin evaporare, membrana lor se ratatinează. Acest aspect reprezintă un artefact care nu se mai constată la repetarea frotiului întins în strat subțire și uscat prin agitare rapidă.

După Bessis și alți autori (30, 31, 164), eritrocitele crenelate reprezintă, pînă la un anumit grad, o formă de echilibru, cu posibilitatea de revenire la aspectul inițial. Forma „zbîrcită" poate fi ușor reprodusă *in vitro* prin mijloace foarte variate: spălarea eritrocitelor cu soluții saline sau în mediu cu pH 9,5, suspendarea lor în soluții conținînd mici cantități de alcool, bilă, lecitină, anticoagulanți etc., și chiar prin păstrarea sîngelui timp de cîteva ore între lamă și lamelă sau prin învechirea lui. Un mare număr de soluții pot să redea eritrocitelor spinoase forma lor discoidală inițială, astfel plasma sanguină proaspătă, globulinele (în concentrație de 1/8 000), glucoza (1/25 000), gelatina (1/100), soluțiile cu pH 4,5—5 etc., (6) (fig. 3-31). Dincolo de anumite limite însă echinocitoza devine ireversibilă. Cu ajutorul stereoscanului s-au putut observa, în 90% din cazuri, aproximativ 40—50 spiculi pe suprafața unui echinocit (fig. 3-32). Forma lor este variabilă, atît la eritrocitul normal, cît mai ales în cazul cînd această transformare este indusă în eritrocitele patologice; astfel, în anumite hemoglobinoze, pot fi observate mici conuri cu o înălțime de 0,5—1 μ și chiar aspecte de coarne de melc cu o lungime de peste 5 μ (fig. 3-37) (28, 31).

În 1952 Singer și colab. au descris acantocitoză datorită unei anomalii cu caracter ereditar a structurii membranei eritrocitare, prin lipsa unei beta-lipoproteine. Basser și Kornzweig au descris o formă de acantocitoză

* Cuv. gr. *akantis*=spin, iar *ekinos*=arici de mare.

Scanned with OKEN Scanner

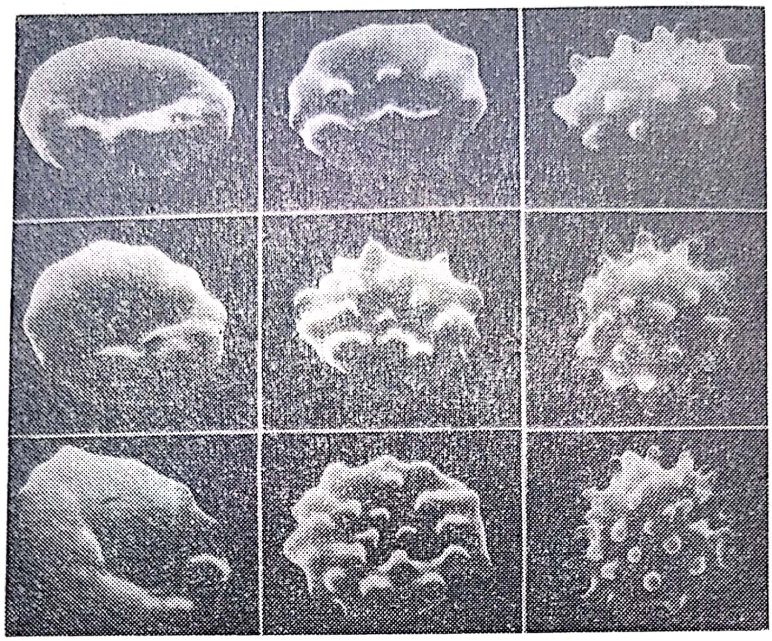


Fig. 3-31. Etape de trecere între discocit şi echinocit (după M. Bessis şi M. Prenant, 1972).

Echinocit I (coloana din stînga): contur uşor neregulat; *echinocit II* (mijloc): spiculi pe toată suprafaţa; *echinocit III:* oval, apoi sferic, cu spiculi dispuşi în toate sensurile. Transformarea de la eritrocit I la eritrocit III are loc în 4—6 secunde; în cazul revenirii la starea de discocit se observă aceleaşi secvenţe în sens invers. În condiţii experimentale spiculii apar totdeauna în acelaşi loc, atît pe echinocitul normal, cît şi pe eritrocitele patologice ceea ce pledează pentru omogenitatea structurală a eritrocitului.

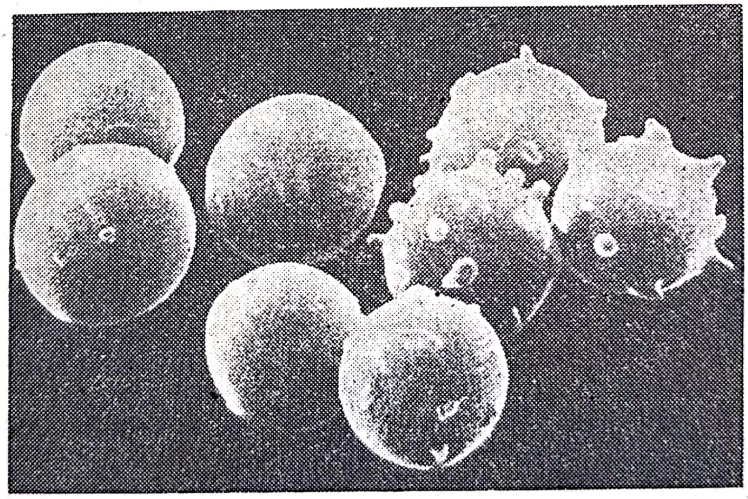


Fig. 3-32. Sfero-echinocite cu tendinţă la transformare în sferocite complete (după M. Bessis şi M. Prenant, 1972).

Dacă substanţele „echinocitogene" sînt foarte active sau dacă procesul reversibil se repetă de foarte multe ori (de exemplu de 40—50 de ori sau mai mult), toate eritrocitele normale (chiar şi cele tinere şi rezistente) se transformă în sfere complete, forme ireversibile ce reprezintă un stadiu prehemolitic.

Scanned with OKEN Scanner

cu lipsa β-lipoproteinelor însoţită de tulburări neurologice grave cu localizare în zona extrapiramidală. În contrast cu raritatea acantocitozei ca boală cu caracter bine individualizat, aspectul crenelat poate fi întîlnit în numeroase alte stări morbide. Echilibrul, discocit/echinocit este dependent

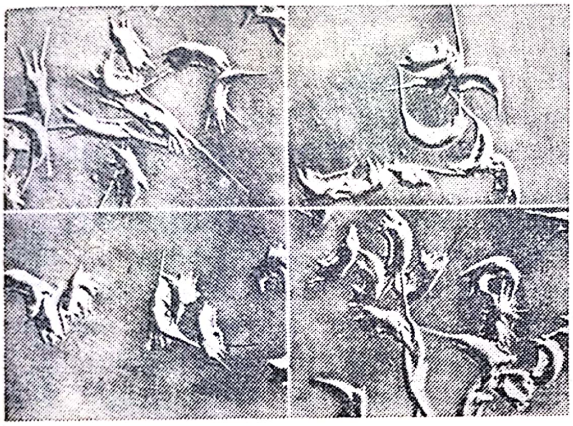


Fig. 3-33. Eritrocite falciforme la om văzute prin tehnica umbririi.

Eritrocitele falciforme sînt rigide şi se aglomerează provocînd adesea blocarea circulaţiei în capilare; la această agregare contribuie şi filamentele lungi de la capetele ascuţite ale celulei (aspect de „spice").

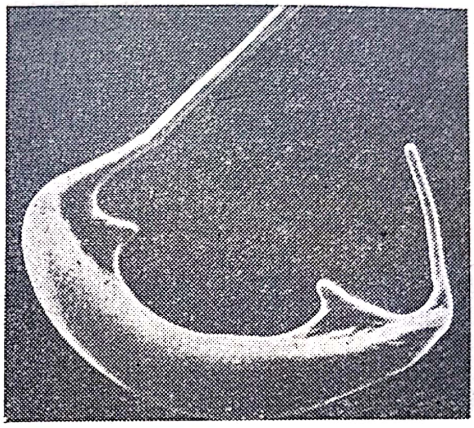
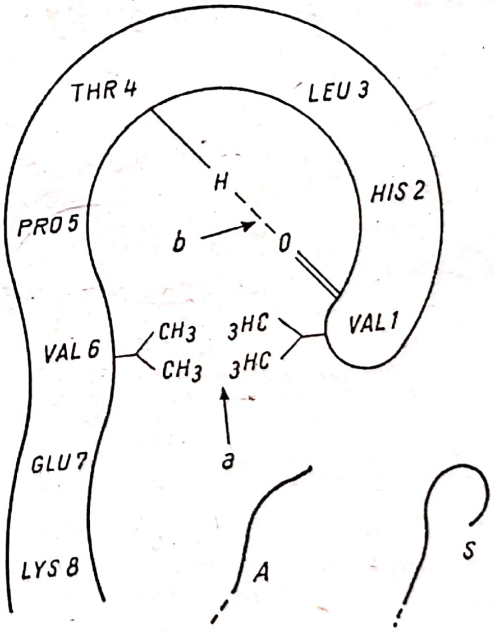


Fig. 3-34. Discocit S în mediu redus (eritrocit falciform văzut la stereoscan; mărire de 8 930 ×) (după M. Bessis, J. Döbler şi P. Mandon, 1970).

Fig. 3-35. Reprezentare schematică a „buclei Murayama" formată la nivelul extremităţii N-terminale a lanţului β în hemoglobinoza *S* (după R. Creyssel, 1972).

Murayama (223), explică substratul molecular al fenomenului de siclizare astfel: lanţul β prezintă, în condiţii normale, un radical valinic în poziţia 1 (acid aminat apolar) şi un radical acid glutamic în poziţia 6 (acid aminat polarizat, monoamino-diacid). Prin înlocuirea acestuia cu o valină, cele două valine (poz. 1 şi 6) tind să se apropie sub influenţa forţelor Van der Waals (a). Pe de altă parte, apare o legătură de hidrogen suplimentară între treonina din poz. 4 (de la —NH) şi gruparea CO a valinei din poz. 1, care nu există în condiţii normale (b). Prin aceasta, extremitatea N. terminală a lanţului β se incurbează, favorizînd unirea moleculei de Hb patologică (lanţul β), cu o moleculă normală de Hb din imediata vecinătate (lanţ α). Lanţul α prezintă, în una din meandrele sale spaţiale, un orificiu de „lacăt" adecvat capătului N terminal ciclizat care joacă rolul de „cheie". În sprijinul acestei ipoteze vine hemoglobinopatia C unde, de asemenea, este înlocuit acidul glutamic din poziţia 6 dar nu cu o valină (acid aminat hidrofob), ci cu lizina (acid aminat puternic ionizat, diamino-monoacid). *Jos:* comparaţie între formele extremităţilor N-terminale ale lanţurilor β ale hemoglobinelor A. şi B.



de numeroşi factori; unii sînt de natură extrinsecă (factori legaţi de plasmă), iar alţii de natură intrinsecă, ţinînd de tulburări ale producerii de energie prin glicoliză (deficit de hexokinază, piruvatkinază), alterări ale

Scanned with OKEN Scanner

pompei ionice etc. În bolile în care primează modificările, datorită factorilor plasmatici, aspectul echinocitelor îmbracă forme caracteristice: „burr cells“ în uremie (cuv. engl. *burr*=ghimpe), „spur-cells“ în ciroză (cuv. engl. *spur*=pinten) etc. (31).

i. **Drepanocitele sau eritrocitele falciforme*** apar în urma transformării reversibile a discocitelor în drepanocite, determinată de polimerizarea patologică a Hb S cu dispoziția hemoglobinei în bastonașe helicoidale. Eritrocitele devin distorsionate, rigide, incapabile de a trece prin capilare înguste și au predispoziție la fragmentare, ceea ce explică hemoliza și formarea de trombusuri în această afecțiune (fig. 3-33 și fig. 3-34) (233).

Fenomenul de siclizare. Eritrocitele cu un conținut aproape exclusiv de Hb S, plasate într-un mediu normal de pH și de tensiune a O_2, sînt apte pentru funcția lor transportoare de oxigen. Hb S neoxigenată este însă de 100 de ori mai puțin solubilă în lichidul intraeritrocitar sau *in vitro* decît forma oxigenată a Hb A. Dacă eritrocitele purtătoare a acestei hemoglobine patologice intră într-un mediu cu concentrație scă-

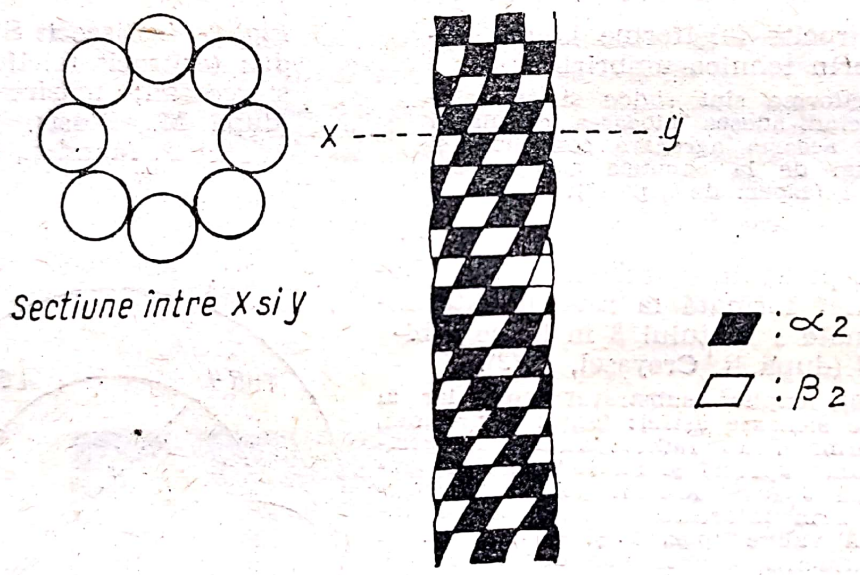


Fig. 3-36. Reprezentarea schematică a unui „microtubul“ format din „împletirea“ moleculelor de hemoglobină S polimerizat linear (după R. Creyssel, 1972).

Molecula de Hb S, în locul aspectului sferoid, are forma unui lanț alcătuit din 6—8 filamente care se răsucesc ca o frînghie, ceea ce duce la distorsionarea eritrocitului; aceste cabluri vide, care realizează structuri pentenare de hemoglobină patologică, sînt răspunzătoare de hemoliză și de formare de trombi vasculari. Oxigenul, propanul și alți factori, desfac aceste asocieri.

zută de oxigen (sinusuri venoase de stază), mediul lor intern devine vîscos, după care urmează precipitarea hemoglobinei cu formare de paracristale sau tactoizi (fig. 3-35). Aceste semicristale au putut fi observate la microscopul electronic sub formă de șiraguri cu o lungime de 1—16 μ care modifică profund structura internă a eritrocitelor, în consecință și forma lor (fig. 3-36 și fig. 3-38, imaginea de jos).

* cuv. gr. *drepane*=seceră și cuv. lat. *falx-falcis*=seceră, ca și cuv. engl. *sickle*.

Forma de seceră nu este singurul aspect ce poate rezulta din polimerizarea moleculelor de hemoglobină; se pot întîlni cele mai bizare forme; în ce privește echinocitoza, drepanocitele au în comun predispoziția la prelungiri, care sînt însă mai subțiri și mai lungi decît la eritrocitele normale, datorită formării, în spiculii acestora, de tactoizi de Hb S (fig. 3-37).

Cu ajutorul microscopului electronic s-a putut observa că dispoziția polimerilor de Hb S este radiară în centrul celulelor, iar în spiculi, bastonașele sînt întrucîtva paralele cu membrana, fără să adere la ea (fig. 3-38). În afara hemoglobinei polimerizate, există o anumită cantitate de hemoglobină nepolimerizată; dacă se procedează la îndepărtarea ei

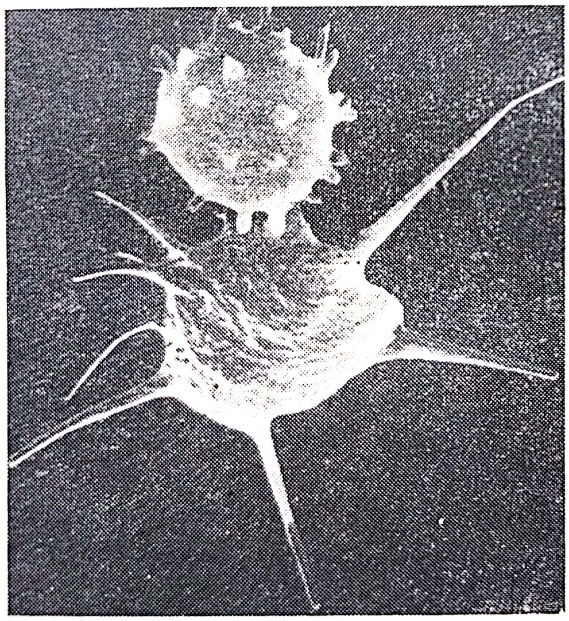


Fig. 3-37. Echinocit normal și echinocit patologic în soluție salină hipertonă (după M. Bessis, J. Döbler și P. Mandon, 1970).
Sus: echinocit normal cu tetramerii de hemoglobină nepolimerizați. *Jos:* eritrocit din siclemie cu hemoglobină polimerizată în bastonașe lungi, orientate în toate sensurile. Spre deosebire de siclizarea indusă prin hipoxie, cînd polimerizarea se face bidimensional, echinocitul din siclemie, pus în mediu salin, prezintă o polimerizare în toate sensurile; în figură prelungirile se aseamănă cu coarnele de melc (mărire de 8 930 ×).

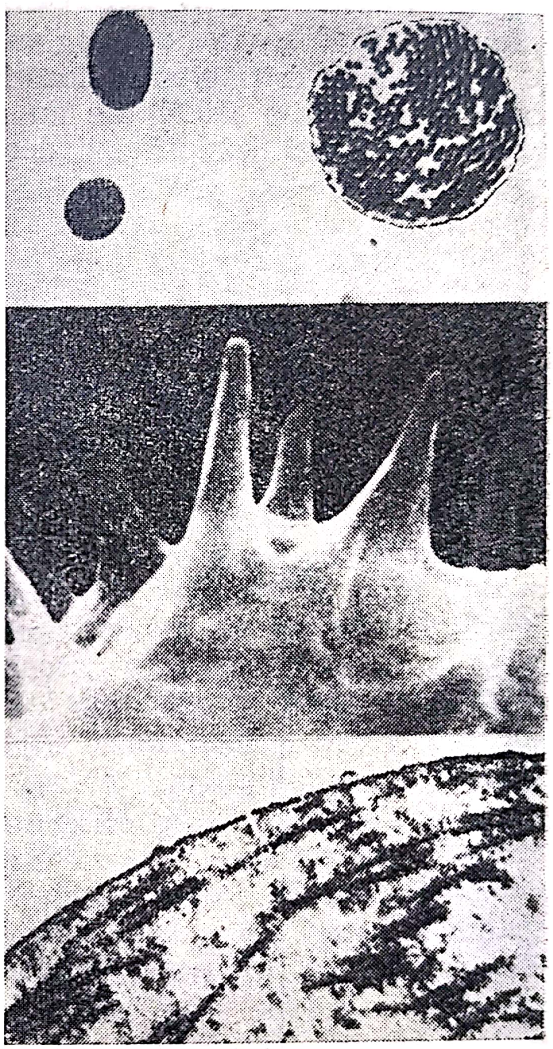


Fig. 3-38. Polimeri de hemoglobină în secțiune transversală și longitudinală printr-un echinocit din siclemie (după M. Bessis și J. Döbler, 1970).
Sus: secțiune transversală în prelungirile (spiculii) unui echinocit SS (siclemie homozigotă). În *stînga sus* secțiunea s-a efectuat într-un spicul cu o masă de hemoglobină nepolimerizată; în dreapta sus secțiunea s-a făcut într-un spicul cu Hb parțial hemolizată; hemoglobina nepolimerizată a dispărut prin liză, persistînd bastonașele de hemoglobină polimerizată, niciunul din aceste baghete nu aderă de membrană (microscopie la stereoscan). *Mijloc:* aspect tridimensional al tentaculelor unui echinocit SS (imagine la stereoscan). *Jos:* secțiune longitudinală într-un eritrocit de siclemie cu Hb polimerizată în baghete (microscopie electronică).

Scanned with OKEN Scanner

prin hemoliză, polimerii (care rezistă hemolizei), sînt mai vizibili (28).

B. INCLUZII ERITROCITARE

Incluziile eritrocitare sînt formaţii de natură heterogenă, conţinute în eritrocite (101). Ele au aspecte variate (formă, volum, număr, aşezare, culoare), semnificaţii deosebite şi modalităţi diferite de evidenţiere (tabelul 3-6).

Tabelul 3-6

INCLUZII ERITROCITARE	I Persistenţa nucleilor sau a resturilor nucleare	A. Întîrzierea expulzării nucleare	Eritroblaşti oxifili
		B. Persistenţa cromozomilor aberanţi	Corpi Howell-Jolly
		C. Reminiscenţe ale cromatinei nucleare	Granulaţii azurofile
	II Incluzii citoplasmatice	A. Vestigii ale imaturităţii citoplasmei	Reticulocite Granulaţii bazofile Inele Cabot
		B. Agregate de hemoglobină instabilă	Corpi Heinz Tactoizi
		C. Incluzii metalice	Siderozomi
	III Incluzii de origine extrinsecă	Eritrocite parazitate	Paraziţii malariei Bartonella bacilliformis Piroplasma bovina

1. PERSISTENŢA NUCLEILOR SAU A RESTURILOR NUCLEARE

a. **Precursori eritrocitari în sîngele periferic.** Sîngele circulant normal nu conţine eritroblaşti; prezenţa lor este un indiciu de activitate eritropoietică anormală; constatarea lor traduce, fie un defect în controlul migrării elementelor nematurate din măduvă spre circulaţie sau o hiperactivitate medulară intensă, fie o eritropoieză extramedulară, eventual asocierea mai multor cauze. Eritroblaştii pot fi observaţi în sîngele periferic în cazurile de anemie severă de cauze diverse (hemoragii masive, hemoliză, în eritremii, leucemii acute, în metastazele canceroase, în ca-

zurile de metaplazie mieloidă etc.). În talasemia majoră numărul lor poate fi foarte ridicat, întrecîndu-l chiar pe cel al leucocitelor.

Cel mai frecvent eritroblaştii sînt oxifili; cînd tulburările sînt accentuate pot apărea şi eritroblaşti policromatofili sau chiar bazofili. În aceste cazuri ei pot fi confundaţi uneori cu limfocitele mici (mai ales microblaştii), de aceea semnalarea lor pe buletinele de analiză trebuie făcută cu discernămînt şi prudenţă, ţinînd seama de semnificaţia specială a eritroblaştilor în sîngele periferic.

b. **Corpusculii Howell-Jolly.** Aceste incluzii eritrocitare se prezintă sub formă de granulaţii rotunde, dense, colorate în albastru închis sau în violet, unice sau în număr redus (2—3 într-un eritrocit), cu dimensiuni de aproximativ 1 μ sau chiar mai mult. Ele sînt net vizibile la coloraţia May-Grünwald-Giemsa fără să necesite, pentru evidenţierea lor, coloraţii speciale.

Corpusculii Howell-Jolly reprezintă condensări de cromatină nucleară rămasă în mod patologic în eritrocit; dovada naturii lor nucleare (conţinut bogat în ADN), o face reacţia Feulgen (care apare pozitivă). Prezenţa lor a fost interpretată, mai de mult, ca un rezultat al fărîmiţării nucleului prin cariorexă, mijloc prin care eritroblastul s-ar debarasa de nucleul său. Este stabilit că ei rezultă din picnoza unor cromozomi. În cazurile diviziunii anormale din cursul migrării spre cei doi poli ai celulei, fragmente de cromozomi, sau chiar cromozomi întregi, „întîrzie" pînă după constituirea membranei nucleare, rămînînd aberanţi în citoplasmă, iar la expulzia nucleului nu părăsesc celula odată cu acesta.

Corpii Howell-Jolly se întîlnesc şi în eritrocitele normale, dar într-un procent foarte redus; ei se întîlnesc în număr mai mare în măduva osoasă a fătului sau a nou-născutului. Numărul lor creşte în anumite stări patologice; se pot întîlni în toate anemiile grave dar mai ales în anemiile megaloblastice unde constituie un semn important pentru diagnostic. În această grupă de boli caracterele lor sînt variate: număr mare, dimensiuni inegale în acelaşi eritrocit, uneori dispoziţie în rozetă. Corpii Howell-Jolly au fost observaţi în număr mare după splenectomie, precum şi în cazurile rare de atrofie splenică, absenţa congenitală a splinei etc.; de asemenea sînt descrişi în talasemie, leucemie, sprue etc. (342).

c. **Granulaţiile azurofile** sînt punctaţii a căror semnificaţie nu este pe deplin lămurită; ele sînt, probabil, reminiscenţe ale distrugerilor patologice a cromatinei nucleare care rămîne dispersată sub formă de mici particule în interiorul citoplasmei. Granulaţiile azurofile apar la coloraţia M.G.G. sub formă de punctaţii rotunde roşii-violet. Ele se deosebesc de corpusculii Howell-Jolly, care sînt mai mari, mai rotunzi şi mai tahicromatici; unele ar putea fi confundate cu depunerea de colorant pe proteinele plasmatice de pe suprafaţa eritrocitară. Prezenţa lor în eritrocite a fost semnalată mai ales în anemiile grave, în leucemiile acute, anemia pernicioasă etc. (14).

Scanned with OKEN Scanner

2. VESTIGII ALE IMATURITĂŢII CITOPLASMEI

În cursul maturării eritroblaştilor există două procese citoplasmatice care se modifică în sens contrar: încărcarea cu hemoglobină care creşte şi metabolismul celular care diminuă, cu menţinerea echipamentului enzimatic necesar unei activităţi metabolice restrînse şi strict specializate. Astfel, organitele celulare, acizii nucleici, o serie de enzime şi alte substanţe, scad treptat, unele pînă la dispariţie (vezi şi fig. 2-8). Bazofilia şi policromatofilia eritrocitelor este indiciul că maturarea citoplasmei a rămas în urma maturării nucleului (terminată prin expulzia lui). Maturarea completă a citoplasmei nu se realizează însă în măduva osoasă. Eritrocitele tinere (reticulocitele) părăsesc măduva cu o încărcare de hemoglobină de 80—95%, maturarea desăvîrşindu-se în circulaţia sanguină, unde îndeplinesc şi funcţia de transportoare de oxigen.

Ribonucleoproteinele şi alte organite celulare pot fi precipitate, fie supravital, fie intravital. *Precipitarea supravitală* se face artificial prin punerea în contact a eritrocitelor, încă „supravieţuitoare", cu o substanţă care să se fixeze pe aceste formaţiuni; ele apar sub forma reţelei granulo-filamentoase a reticulocitelor, care nu este vizibilă la coloraţia May-Grünwald-Giemsa. *Precipitarea intravitală* a substanţei bazofile a reticulocitelor are loc numai în condiţii patologice. În cazul intoxicaţiilor, toxicul, de multe ori un metal greu (de exemplu plumbul), pătrunde prin membrana reticulocitară precipitînd substanţele nehemoglobinice, determinînd apariţia unor granulaţii bazofile ce se pot pune în evidenţă şi cu coloraţia May-Grünwald-Giemsa.

a. **Reticulocitele** sînt eritrocite imature care circulă în sîngele periferic 1—3 zile, timp în care îşi desăvîrşesc maturarea morfologică şi funcţională. Reticulocitele reprezintă un stadiu evolutiv intermediar între eritroblastul oxifil şi eritrocitul adult, motiv pentru care unii autori le numesc şi „proeritrocite". Denumirea de reticulocite provine de la reţeaua reticulo-filamentoasă ce se observă în interiorul lor la coloraţia supravitală (fig. 3-39). Prezenţa organitelor celulare şi a altor substanţe, pe lîngă hemoglobină, conferă reticulocitelor dimensiuni mai mari (8—9 μ) şi un volum de 150 μ^3 sau mai mult.

Văzute la microscopul cu contrast de fază şi la microcinematografie, sau cu alte tehnici microscopice, reticulocitele în stare proaspătă prezintă mişcări proprii, cu deformarea permanentă a conturului; în urma contracţiilor pe care le prezintă, ele pot lua forme de treflă, trifoi cu 4 foi etc. (fig. 3-40).

Reticulocitele reprezintă echivalentul eritrocitelor policromatofile de pe frotiul de sînge periferic, încît există un paralelism între numărul de macrocite policromatofile la coloraţia panoptică şi numărul de reticulocite puse în evidenţă la coloraţia supravitală. Confirmarea că substanţa bazofilă din reticulocite este formată, în principal, din ribonucleoproteine, o aduce şi faptul că ele dispar sub acţiunea ribonucleazei.

După desăvîrşirea maturării reticulocitelor reţeaua granulo-filamentoasă dispare printr-un mecanism care nu este încă bine lămurit. Se

Scanned with OKEN Scanner

cunoaşte influenţa splenectomiei asupra creşterii numărului de reticulocite. Prin dispariţia organitelor citoplasmatice şi a altor substanţe, dimensiunile reticulocitelor se reduc la cele ale eritrocitului adult, iar culoarea lor devine roz. Prezenţa elementelor citoplasmatice amintite conferă reticulocitelor, cu toată lipsa nucleului, o activitate metabolică mult

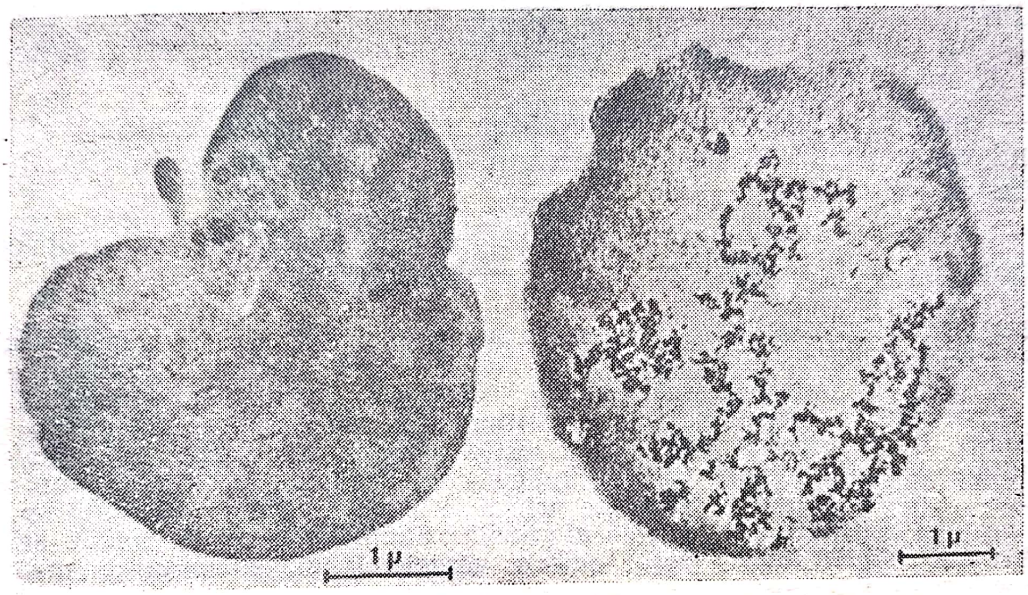


Fig. 3-39. Reticulocite examinate la microscopul electronic înainte (stînga) şi după (dreapta) precipitarea ribozomilor cu albastru de crezil briliant (mărire 8 000×) (după M. Bessis, 1866).

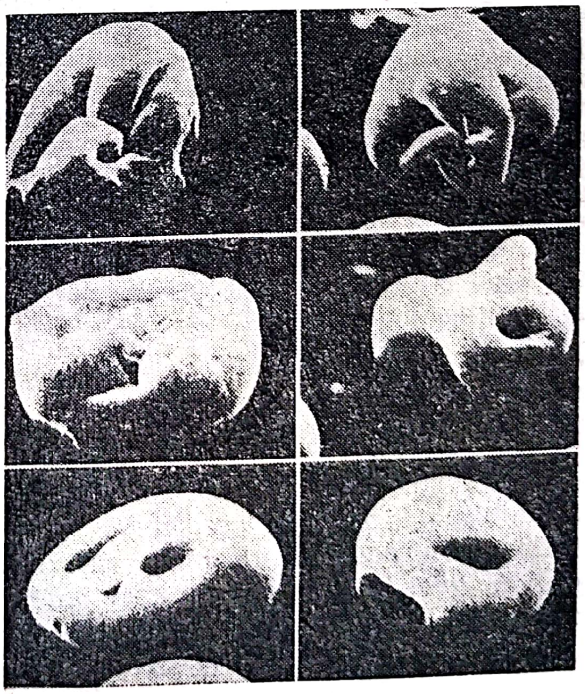


Fig. 3-40. Reticulocite cu morfologie variată văzute la stereoscan (după M. Bessis, 1973).

Aspectul polimorf nu traduce o stare patologică (poikilocitoză), ci deformările în cursul mişcărilor proprii.

Scanned with OKEN Scanner

crescută față de aceea a eritrocitelor. Aceste elemente citoplasmatice au roluri multiple:

— continuă sinteza hemoglobinei pînă la saturația completă a eritrocitului (sinteza de proteine care are loc la nivelul ribozomilor reticulocitari interesează, practic, exclusiv globina);

— conferă celulei o activitate „respiratorie" (care lipsește în eritrocite) prin persistența, în anumite limite, a ciclului tricarboxilic, din care rezultă un surplus energetic folosit, în primul rînd, pentru sinteza în cantitate mai mare a ATP;

— mențin o activitate proteolitică crescută, acizii aminați eliberați servind ca substrat energetic endogen (doar circa 20% din CO_2 format provine din glucoză);

— permit reticulocitelor mișcări de diapedeză, cu ajutorul cărora pot trece din spațiul medular în capilarele sanguine.

Deși sînt mai mari și cu o nuanță ușor policromatofilă, cifra de reticulocite nu poate fi determinată cu certitudine pe frotiul colorat panoptic, identificarea fiind nesigură, ceea ce face necesară utilizarea colorației supravitale. Colorantul intră rapid în reacție cu organitele vii, precipitîndu-le; structurile celulare, sub limita vizibilității la microscopul optic, devin astfel vizibile. Colorațiile supravitale sînt în realitate coloații „letale" pentru reticulocite, deoarece, paralel cu punerea în evidență a rețelei, colorantul sfîrșește prin a le „omorî". Dintre coloranții „precipitanți" cel mai frecvent utilizat este *albastrul briliant de crezil* în soluție alcoolică 0,5—1%; mai pot fi folosiți roșul neutru, verdele Janus, albastrul de metilen și alții.

În interiorul citoplasmei granulațiile sînt mai numeroase la început, apoi numărul lor diminuă pe măsură ce reticulocitele avansează în vîrstă (142). Autori mai vechi au încercat să delimiteze diferite etape în maturația eritrocitelor, începînd cu reticulocitul foarte tînăr — imediat după expulzia nucleului — pînă la stadiul premergător eritrocitului adult, stabilind astfel 4 clase de maturație: forma cu substanța granulo-filamentoasă dispusă în ghem, forma cu substanța dispusă în rețea laxă, forma cu rețea incompletă și forma cu granulații rare și dispersate. În prezent această grupare și-a pierdut din importanța practică. Rețeaua granulo-filamentoasă dispare de pe frotiul colorat în cîteva zile; pentru păstrare, în vederea demonstrațiilor ulterioare, este recomandată supracolorarea cu produsul Romanowski. Anumite greșeli de tehnică pot afecta evaluarea numărului de reticulocite, de exemplu cînd se extrage o picătură prea mică de sînge, efectul sicativ al atmosferei este prea rapid încît reactivul nu este în măsură să impregneze organitele reticulocitelor, ele apărînd de o vîrstă mai avansată (eritrocite).

Reticulocitele pot fi confundate rareori cu corpii Heinz, care, de asemenea, se impregnează cu coloranții vitali; morfologic reticulocitele se deosebesc de aceștia prin dispoziția granulelor în rețea fină, spre deosebire de corpii Heinz, care sînt mari, cu aspect colțuros, de obicei unici și dispuși la periferia eritrocitelor (vezi pag. 210). Structural cele două tipuri de incluzii sînt complet diferite, granulațiile reticulocitelor fiind alcătuite din resturi citoplasmatice, iar corpii Heinz din agregate de hemoglobină instabilă.

Determinarea numărului de reticulocite are o valoare semiologică deosebită, fiind indispensabilă în toate formele de anemii. Numărul de reticulocite reflectă eficiența activității proliferative a măduvei, creșterile putînd avea o valoare prognostică favorabilă, de exemplu în tratamentul anemiilor aregenerative, sau diagnostică, de exemplu în anemiile hemolitice.

Scanned with OKEN Scanner

Numărul normal de reticulocite al unui adult este cuprins între 5 și 20 la 1 000 de eritrocite. În măduva adultului cifrele sînt de 2—4 ori mai mari (20—40‰); valoarea practică a determinării reticulocitelor în măduvă este însă redusă, rezultatul fiind mult influențat de amestecul sucului medular cu sîngele din sinusurile venoase. Majoritatea eritrocitelor extrasinusale sînt reticulocite care se pregătesc de diapedeză. Acest sector pare să fie lipsit de eritrocite mature, în afara unui număr mic, ce provine direct din „eritrocitele nucleate" (eritroblești oxifili, în care citoplasma s-a maturat complet, deși mai persistă un nucleu picnotic; acestea neputînd părăsi măduva, rămîn blocate in situ; ele nefiind transportoare de oxigen, sînt fagocitate de către macrofagele extrasinusale.

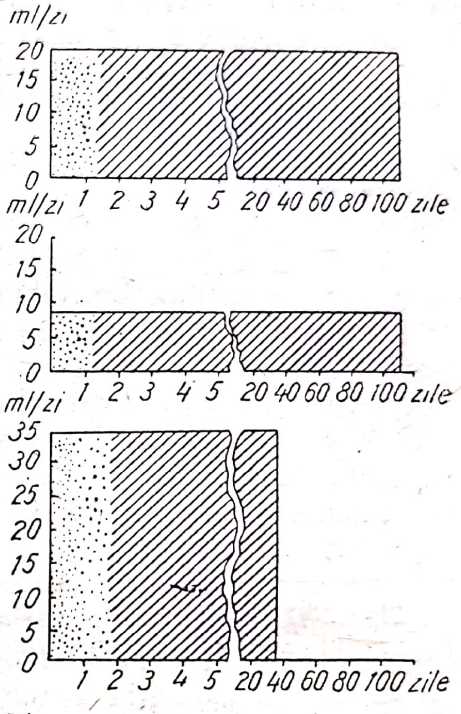


Fig. 3-41. Numărul de reticulocite (zona punctată) și de eritrocite (zona hașurată) pe unitate de volum de sînge total (după H. Heimpel, 1966).

Sus, la individul normal, *mijloc*, în anemiile aregenerative și *jos* în anemia hemolitică. Cifra absolută de reticulocite corespunde suprafeței cîmpului punctat, iar cifra relativă, raportului dintre cîmpul punctat și suprafața totală.

În afară de cifrele procentuale, numărul de reticulocite trebuie exprimat și în cifre absolute. Valoarea reticulocitozei normale este cuprinsă între 30 000 și 80 000 pe mm³ (în medie 60 000). O reticulocitoză însă de 1,5%, la 3 000 000 de eritrocite, care reprezintă o cifră absolută de 45 000 pe mm³, deci o valoare ce se situează în limitele normalului, arată o producție medulară nesatisfăcătoare pentru corectarea anemiei. O reticulocitoză de 10% la 2 000 000 reprezintă o valoare absolută de 200 000, deci un ritm de producție eritrocitară mai rapid. În cazul unor cifre eritrocitare scăzute, repopularea sîngelui cu eritrocite se face deci într-un ritm mai lent decît cel sugerat de valoarea procentuală. În interpretarea cifrelor reticulocitare trebuie avută în vedere și durata de viață scăzută a eritrocitelor din anemiile hemolitice deoarece, pentru o compensare eficientă, numărul de reticulocite trebuie să crească proporțional cu sistarea acesteia (în aceste cazuri calcularea în cifre absolute de reticulocite este cu atît mai importantă) (139, 143) (fig. 3-41).

Cifra de reticulocite trebuie interpretată și în funcție de echilibrul dintre proliferarea și maturarea seriei eritrocitare medulare. Astfel, în proliferările în care are loc o mitoză suplimentară (de exemplu 5 mitoze în loc de 4), stadiul de reticulocit circulant se scurtează la o zi, iar numărul de reticulocite apare mai scăzut și cu o rețea granulo-filamentoasă mai săracă. În situațiile în care numărul de mitoze este mai mic (de exemplu 3 în loc de 4 sau 5), maturarea fără diviziune începînd într-un stadiu precoce, numărul de reticulocite apare mare, deoarece reticulocitele cu rețea granulofilamentoasă bogată rămîn în stadiul de reticulocit timp mai îndelungat (3—4 zile). Din aceste cauze numărul de reticulocite nu reflectă totdeauna exact intensitatea și eficiența eritropoiezei. De asemenea reticulocitoza trebuie

Scanned with OKEN Scanner

interpretată şi în funcţie de solicitările periferiei (de exemplu în hipoxie); în măduva hematoformatoare există, extrasinusal, o cantitate apreciabilă de reticulocite care sînt eliberate mai rapid dacă nevoile periferiei o reclamă (fig. 3-42).

La copil cifra de reticulocite diferă de a adultului. În primele luni de viaţă este mai mare, pentru a scădea apoi în jurul valorii de 1%. În cordonul ombilical şi în prima zi de viaţă reticulocitoza variază

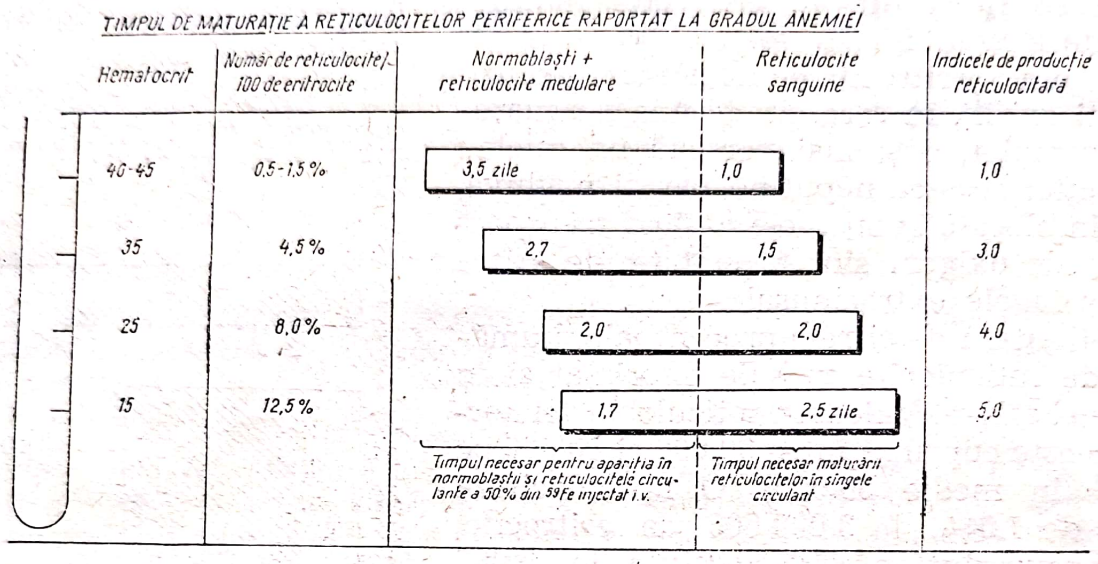


Fig. 3-42. Semnificaţia variaţiilor procentului de reticulocite, raportat la gradul anemiei, exprimată prin hematocrit (modificat după Hillman şi Finch, 1967).

Tranzitul medular al Fe 59 după încorporarea lui în eritroblaşti şi reticulocite şi apariţia lui, în proporţie de 50% din cantitatea injectată, în reticulocitele şi eritrocitele circulante, este de 3,5 zile la indivizii normali, scăzînd proporţional cu gradul anemiei (1,7 zile la un hematocrit de 15). Perioada totală de transformare a fierului nehemoglobinic (eritroblaştii şi reticulocitele medulare, plus reticulocitele periferice), în fier hemoglobinic (eritrocitele circulante), este relativ constantă, însă cu cît anemiile sînt mai severe, cu atît reticulocitele sînt eliberate mai prematur din măduvă, prelungindu-se timpul de persistenţă a lor în sîngele periferic (eliminarea tîrzie a reţelei granulo-filamentoase). Aceste reticulocite premature sînt mai mari şi mai policromofile („deviate" la stînga sau „stimulate"). Indicele de producţie reticulară (coloana 5) rezultă din împărţirea numărului de reticulocite găsit pe frotiu (coloana 2), cu timpul de maturare reticulocitară din sîngele periferic (coloana 4). Calculele au fost efectuate experimental prin comparaţia valorilor normale cu cele din anemiile induse prin flebotomie.

între 3 şi 6% (circa 300 000/mm^3). Activitatea eritropoietică crescută se menţine în cursul primei săptămîni, după care scade rapid, pentru ca după 3 luni să ajungă la valori de 0,5%. Persistenţa unei valori ridicate în acest interval pledează pentru o pierdere eritrocitară (hemoragie, dar mai ales hemoliză).

Scăderea numărului de reticulocite traduce o insuficienţă a măduvei osoase în producţia de eritrocite; ea se întîlneşte în aplazia medulară de orice cauză, în blocajul de maturaţie a eritroblaştilor, în transformarea sau invazia malignă a măduvei (hemopatii, cancere etc.). Reticulocitopenia este mai precoce decît granulocitopenia în boala de iradiere (ambele apărînd însă rapid); reapariţia reticulocitelor după iradiere este un indiciu de repopulare medulară, în timp ce reticulocitopenia tardivă este un semn de prognostic nefavorabil.

Scanned with OKEN Scanner

Creşterea numărului de reticulocite traduce o hiperactivitate medulară eficientă, urmărirea periodică a cifrei reticulocitare fiind de mare utilitate; o reticulocitoză crescută se întîlneşte în anemiile hemolitice cu măduvă hiperplazică eficientă, stările consecutive hemoragiilor, tratamentul eficace al anemiilor carenţiale (megaloblastice, sideropenice etc.), cînd se realizează criza reticulocitară de la sfîrşitul primei săptămîni de tratament. La femeile gravide, izoimunizate prin sarcină, se remarcă o creştere relativă a reticulocitelor (2—5%) în legătură cu incompatibilitatea serologică feto-maternă (testul Kondi şi Iacobescu) (164).

b. **Granulaţiile bazofile** apar pe frotiul colorat cu M.G.G. sub formă de granule de culoare albastră sau albastru-violaceu răspîndite, uniform sau neregulat, pe toată suprafaţa eritrocitului. Mărimea lor este variabilă; ele pot fi mici şi rotunde sau voluminoase şi neregulate. Cel mai bine pot fi puse în evidenţă prin coloraţia cu albastru de metilen.

Eritrocitele cu punctaţii bazofile sînt elemente imature patologice ale căror incluzii au aceeaşi provenienţă ca şi cele ale reticulocitelor dar, spre deosebire de acestea, în eritrocitele cu granulaţii bazofile precipitarea reţelei granulo-filamentoase apare intravital, fapt care permite punerea lor în evidenţă cu coloraţia panoptică. Ele sînt formate din ribonucleoproteine, fiind distruse de ribonuclează. Din cauza alterării ribonucleoproteinelor, hemoglobina este împiedicată să se sintetizeze în mod normal, dovadă creşterea protoporfirinei libere eritrocitare, precum şi alte semne de tulburare a metabolismului porfirinelor.

Granulaţiile bazofile se observă frecvent în cursul diverselor anemii cu regenerare mare eritrocitară, precum şi în acelea în care sinteza hemoglobinei nu se face normal, fiind tulburat echilibrul dintre proliferare şi maturare (anemii megaloblastice, talasemie etc.). Deosebit de frecvent şi precoce apar granulaţiile bazofile în intoxicaţiile cu metale grele (plumb, mercur), urmare pătrunderii acestora în eritrocit unde provoacă precipitarea substanţelor bazofile. Deşi nu sînt patognomonice pentru saturnism, granulaţiile bazofile se întîlnesc în număr mare în această intoxicaţie, încă după primele zile de la ingestia toxicului, chiar în absenţa anemiei. Eritrocite cu punctaţii bazofile au fost găsite în număr mare şi în alte intoxicaţii (ca benzen, oxid de carbon, anilină şi altele).

Aceste granulaţii au putut fi observate chiar şi în cazuri normale, dar în număr foarte redus. Pentru a avea o semnificaţie patologică certă trebuie să fie găsite într-o proporţie de cel puţin 1—2%. După splenectomie numărul lor este constant crescut. S-a observat de asemenea că numărul lor este de 3—4 ori mai mare în sîngele venos decît în sîngele din punctatul digital.

În afara eritrocitelor, granulaţiile bazofile pot fi văzute şi în eritroblaştii de pe frotiurile de măduva osoasă.

c. **Inelele Cabot** (sau corpii inelari Cabot) sînt formaţii filiforme ce apar pe frotiul colorat cu M.G.G. sub formă de linie cu circuit închis de culoare roşie purpurie sau roşie deschis, descriind figuri diferite: cerc, cifra 8, semilună, rachetă etc. (82).

Scanned with OKEN Scanner

Nu a existat unanimitate de păreri în legătură cu semnificaţia acestor formaţii. Reacţia Feulgen pentru acizii nucleici este negativă. Pînă în ultimul timp a persistat părerea că ar reprezenta resturi de membrană nucleară după terminarea lizei nucleului; la această părere a contribuit şi forma liniară circulară a acestor formaţii. Alţii au emis ipoteza că filamentul ar fi un rest al unor formaţii de legătură ce unesc eritroblaştii între ei şi ar reprezenta resturi de membrană după citodiereză. Mai verosimilă este explicaţia că filamentele provin din proteinele tubulare ale fusului mitotic care au rămas neabsorbite după terminarea telofazei.

Inelele Cabot nu sînt patognomonice pentru vreo afecţiune; ele se întîlnesc mai ales în intoxicaţiile cu plumb, precum şi în toate cazurile de anemii grave, într-un stadiu avansat de boală (leucoze, cancere, anemii eritroblastice şi aplastice etc.) ca efect al tulburării mitozei şi a metabolismului celular.

3. AGREGATE DE HEMOGLOBINĂ INSTABILĂ

Hemoglobina se prezintă, normal, sub formă de tetramer, dar niciodată ca polimer (structuri supracuaternare). Polimerizarea moleculelor de hemoglobină cu apariţia de agregate globulare (corpi Heinz) sau liniare (tactoizi) are loc numai ca urmare a instabilităţii structurii cuaternare, iar prezenţa lor în eritrocit traduce o tulburare gravă a metabolismului hemoglobinic.

a. **Corpii Heinz** (descrişi în 1890) sînt agregate eritrocitare de hemoglobină denaturată. Pe frotiul de sînge periferic se prezintă, cel mai frecvent, sub formă de particule unice sau în număr mic, de dimensiuni relativ mari. Forma lor este rotundă sau neregulată şi colţuroasă, iar dispoziţia lor este la suprafaţa eritrocitelor.

Corpii Heinz se evidenţiază bine la coloraţia supravitală cu crezil violet, albastru de Nil (1% în ser fiziologic), violet de metil (0,5% în soluţie salină) sau chiar cu soluţie salină de albastru briliant de crezil. Se observă bine şi în celulele în stare vie sau prin tehnica umbririi cu aur (fig. 3-44). Alteori se observă corpi Heinz chiar în afara eritrocitelor sau eritrocite legate de corpii Heinz la oarecare distanţă de acestea, legaţi printr-o membrană subţire (aspect de paraşută deschisă cu corpusculul tahicromatic legat printr-un voal conic la o distanţă de 10—15 μ). Explicaţia acestor aspecte este dată de fragilitatea membranei la locul de implantare a corpului Heinz; în această zonă ea se rupe mai repede în cursul întinderii frotiului dînd impresia de expulzie (3) (fig. 3-45).

Pentru a provoca o creştere a numărului lor în eritrocite, se poate proceda la incubarea sîngelui timp de 12—48 de ore într-o soluţie de albastru briliant de crezil 1%, după care se pun în contact cu acetilfenil-hidrazidă. Cu ajutorul microscopului electronic cu stereoscan, sau prin criodecapaj, se poate pune în evidenţă şi mai bine natura intracitoplasmatică a acestor formaţii (fig. 3-46 şi 3-47).

Aceste incluzii intraeritrocitare sînt produse de degradarea oxidativă a hemoglobinei, care precipită în interiorul eritrocitelor. Prezenţa lor în talasemiile β este explicată de P. Fesas (1963) prin excesul de

Scanned with OKEN Scanner

lanțuri α libere (tetrameri α) față de catenele non α (β, γ, δ), cu care acestea ar trebui să se combine și care se sintetizează deficitar.

În timp ce granulațiile bazofile apar în eritrocitele tinere, fiind vestigii ale unor corpusculi citoplasmatici, corpii Heinz apar, cu pre-

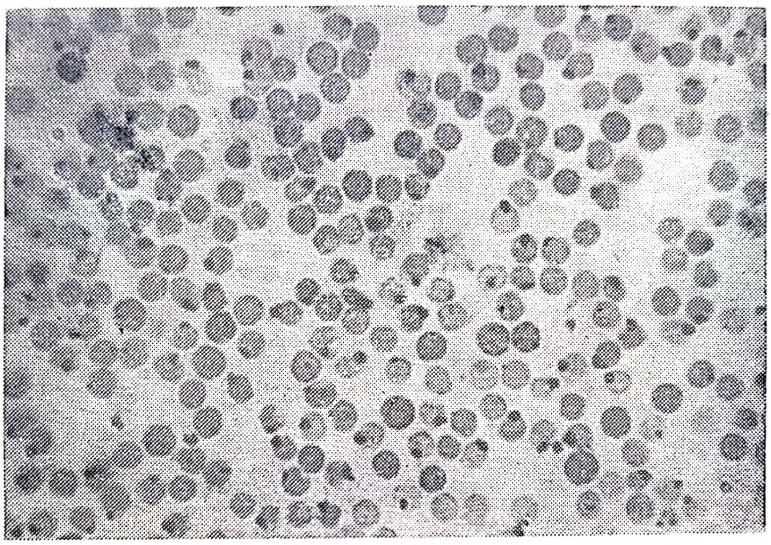


Fig. 3-43. Corpi Heinz (bolnava C. F. de 37 de ani, anemie hemolitică cu hemoglobină instabilă), hemoglobinoză București 42 Phe → Leu pe lanțul β (după V. Bratu, P. A. Lorkin, H. Lehman și C. Predescu, 1971).

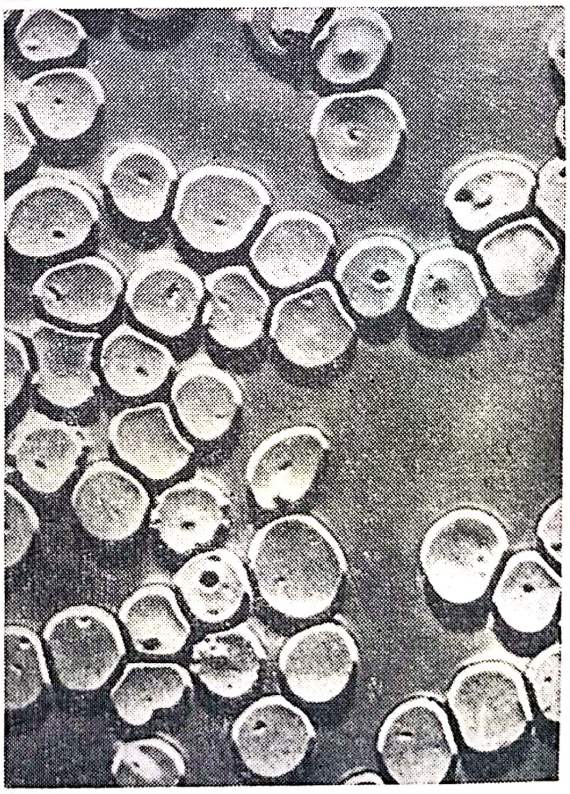


Fig. 3-44. Eritrocite examinate la microscopul optic după umbrire cu aur coloidal, pentru punerea în evidență a corpilor Heinz (mărire 2 000×) (după M. Bessis, 1966).

Scanned with OKEN Scanner

dilecţie, în a doua jumătate a vieţii eritrocitare, cînd hemoglobina a devenit mai oxidabilă. Alteori însă ei apar şi în eritrocitele tinere şi chiar în eritroblaştii evoluaţi, în care hemoglobina alterată poate precipita curînd după sinteza ei. În aceste cazuri s-a observat, cu ajutorul microscopului electronic, în interiorul eritroblaştilor ce conţin corpi Heinz, o cantitate mare de feritină şi micelii feruginoase localizate, adesea, în

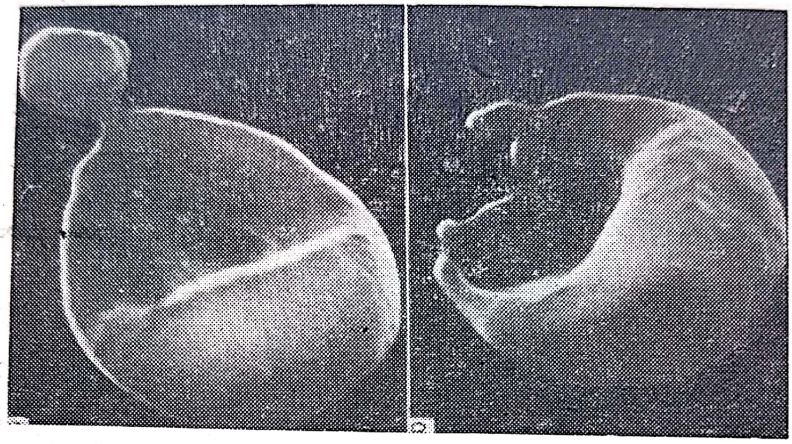


Fig. 3-45. Două eritrocite avînd aceeaşi anomalie producătoare de corpi Heinz (microscopie la stereoscan) (după M. Amare, B. Lawson şi W. E. Larsen, 1972).

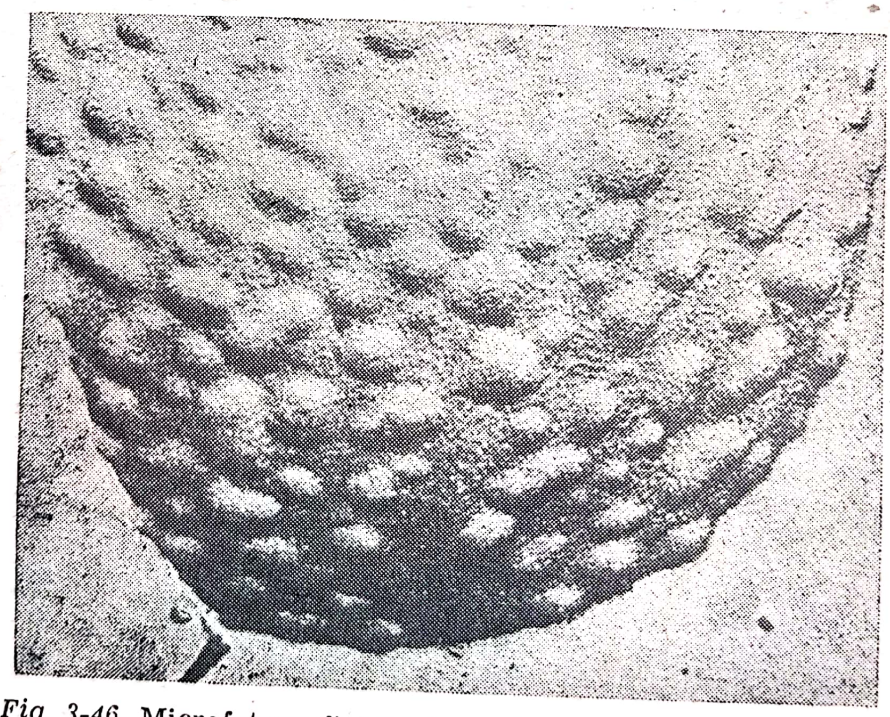


Fig. 3-46. Microfotografie electronică prin criodecapaj a unui eritrocit cu conţinut bogat de corpi Heinz (α-talasemie cu Hb H), după incubaţia cu albastru de crezil briliant (după L. S. Lessin, W. N. Jensen, P. Klug, 1972).

Pe faţa internă a membranei sînt ataşate agregate de hemoglobină instabilă ale căror proeminenţe dau eritrocitului un aspect de „sac cu căpăţîni" sau de „colină cu muşuroaie".

Scanned with OKEN Scanner

interiorul mitocondriilor. Prezența acestor corpusculi în elementele tinere ale seriei roșii, înainte chiar de apariția lor în circulație, traduce o tulburare gravă a sintezei hemoglobinei.

Instabilitatea moleculei de hemoglobină este dată de o labilitate a configurației spațiale; hemoglobina se polimerizează și precipită sub formă de granulații, producînd scurtarea duratei de viață a eritrocitelor. Această

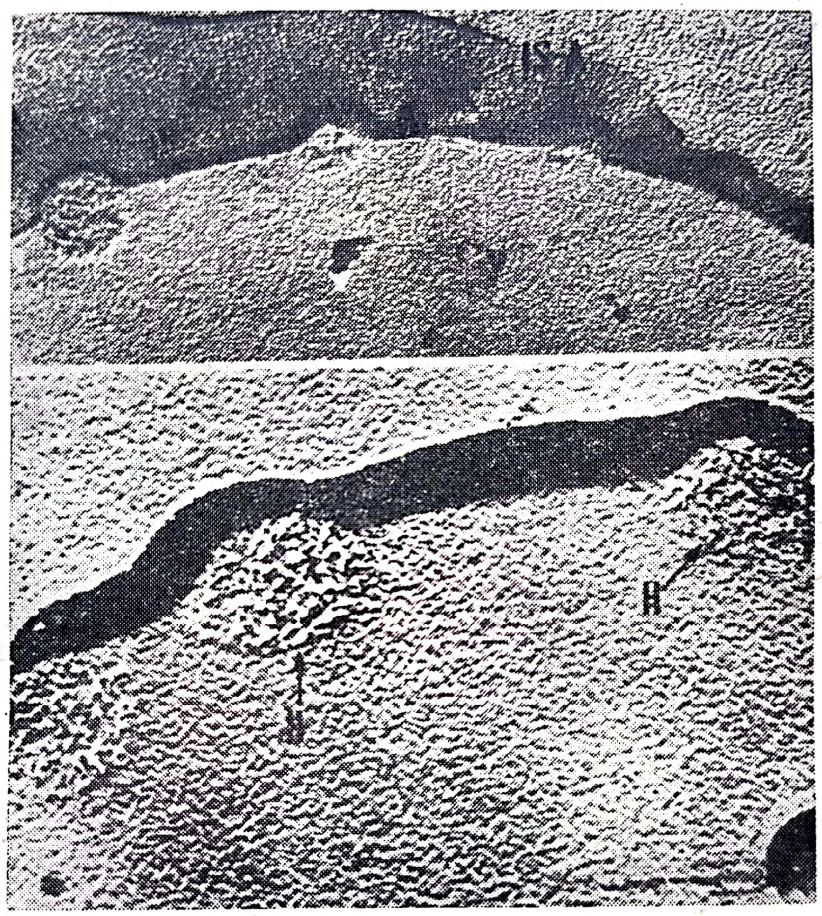


Fig. 3-47. Microfotografie la microscopul electronic și criodecapaj al unui eritrocit cu corpi Heinz (α-talasemie cu Hb H) (după L. S. Lessin, W. N. Jensen, P. Klug, 1972).
Sus, se remarcă legătura intimă între corpii Heinz și suprafața internă a membranei eritrocitare. *Jos,* zona de interferență dintre membrana și citoplasma eritrocitară de care aderă corpii Heinz (H); pe alocuri membrana prezintă prelungiri filamentoase prin care se leagă de aceste formațiuni.

condensare ar putea fi provocată prin mai multe mecanisme: oxidarea rapidă a hemoglobinei (mai ales a grupărilor sulfidice libere), o fragilizare a legăturilor dintre lanțurile α și β (care, atunci cînd sînt izolate, sînt deosebit de instabile), afectarea legăturilor hemoglobină (ceea ce duce la o separare anormală a hemului) etc.

După Lessin și colab. (185), în toate cazurile în care Hb este instabilă, se ajunge la formare de methemoglobină, care pierde de obicei hemul din lanțul β și se leagă rapid de alte hemoglobine denaturate, de glutation sau de alte substanțe

Scanned with OKEN Scanner

din eritrocit. Aceste agregate migrează spre suprafața internă a membranei de care se fixează prin intermediul legăturilor disulfidice ale grupelor tiol. Acest proces alterează plasticitatea și filtrabilitatea eritrocitelor ce conțin corpi Heinz. Blocajul grupărilor tiol duce la perturbarea „pompei de ioni" și, consecutiv, la alterarea homeostaziei electrolitice, cu creșterea permeabilității membranei, pierderea de cationi și ieșirea ATP din eritrocit. Se ajunge la alterarea și creșterea fragilității mecanice a eritrocitelor, care sînt fagocitate mai rapid de către macrofage sau sînt hemolizate osmotic. Splina are posibilitatea de a extrage din eritrocite aceste formații, cît și pe aceea de a hemoliza aceste eritrocite, ceea ce explică creșterea numărului lor după splenectomie.

Corpii Heinz apar într-un număr mare de anemii hemolitice, intra- și extracorpusculare. Dintre afecțiunile intraeritrocitare ei apar atît în unele hemoglobinopatii, cît și în enzimopatii. În afecțiunile enzimatice care interesează sistemul de oxidoreducție a glutationului precipitarea lor poate fi forțată prin administrare bolnavilor, de substanțe oxidante (sulfamide, antimalarice etc.), care scad și mai mult capacitatea sistemului reductor. Dintre afecțiunile extraeritrocitare, corpii Heinz se întîlnesc și în intoxicațiile methemoglobinizante produse de substanțe chimice ca anilina, fenilhidrazida, nitrobenzenul sau unele medicamente (de exemplu sulfamide).

b. **Tactoizii** (cristaloizii din siclemie) (vezi „Drepanocitele", pag. 200).

4. INCLUZII METALICE

Dintre oligoelementele metalice conținute în organismul uman (Fe, Cu, Zn, Mg etc.) fierul se găsește în eritrocite într-o cantitate mai mare, putînd fi decelat chiar cu ajutorul microscopului optic. Precursorii eritrocitari, de la proeritroblești la reticulocite, conțin, în afara fierului hemoglobinic, cantități variabile de fier nehemoglobinic, din care numai o parte poate fi văzută cu microscopul optic, cu ajutorul colorației speciale (colorația Perls). Pentru a putea fi evidențiată este însă necesar ca agregatele de hemosiderină să depășească diametrul de 0,2 μ. Un rezultat histochimic negativ cu această colorație nu demonstrează că în celulă nu s-ar afla fier neheminic, fapt dovedit prin cercetări de microscopie electronică. Rezultatul histochimic pozitiv la individul sănătos atestă doar *ferofaneroza* adică prezența în formă vizibilă a fierului citoplasmatic. Creșterea fierului decelabil prin microscopia optică demonstrează că în cursul hemoglobinizării se depozitează fier de prisos, care ulterior poate fi utilizat în parte pentru sinteza hemoglobinei; o altă parte ajunge însă să fie îndepărtată, probabil, prin funcția splinei de eliminatoare a incluziilor.

Siderozomii. Siderocitele sînt eritrocite care conțin, în interiorul lor, granulații de fier nehemoglobinic ce pot fi puse în evidență prin colorația Perls. Granulele cu conținut de fier se numesc siderozomi; numărul lor variază între 1—20, în medie 5—10, iar dimensiunile variază de la limitele vizibilității la microscopul optic (0,3 μ), pînă la 2—3 μ. Cînd sînt unici ei pot fi relativ mari și dau impresia că sînt atașați din afară pe membrana eritrocitară.

Scanned with OKEN Scanner

Siderozomii pot fi întîlniţi în toate tipurile de eritrocite; astfel se pot găsi sidero-normocite, sidero-megalocite, sidero-reticulocite. Siderocitele sînt celule tinere ce provin din sideroblaştii medulari. Între siderocitele periferice şi sideroblaştii medulari există o identitate de semnificaţie funcţională, iar variaţiile lor patologice trebuie interpretate în acelaşi sens. Existenţa în sîngele circulant a siderocitelor este consecinţa utilizării insuficiente a fierului neheminic pentru sinteza hemoglobinei.

Numărul siderocitelor în sîngele circulant este, în mod normal, foarte redus (0,3‰). La nou-născut ele apar în număr relativ mare (3—17‰) dar în prima săptămînă scad pînă la dispariţie, în timp ce la prematuri cifrele rămîn ridicate pînă prin săptămîna a treia.

Creşterea siderocitelor în sîngele circulant apare la persoanele a căror splină a fost înlăturată (chiar după extirparea unei spline normale, pentru ruptură traumatică). Înmulţirea siderosomilor cu structură grosolană apare şi în cazuri de creştere excesivă a sideremiei, sau cînd există tulburări în sinteza hemului: prezenţa lor într-o anemie hipocromă pledează pentru o tulburare în folosirea fierului (anemie sideroacrestică, talasemie etc.). Intoxicaţia cu plumb duce la înmulţirea siderocitelor, mai ales prin blocarea sintezei porfirinei la nivelul precursorilor acesteia (acid delta-amino-levulinic, porfobilinogen), dar şi în etapele următoare (coproporfirină, hem). Hemolizele de diferite cauze pot determina, uneori, creşteri ale numărului de siderocite. În carenţe de fier siderocitele sînt total absente, însă această constatare nu are valoare semiologică.

5. CORPII INTRAERITROCITARI DE ORIGINE EXTRINSECĂ
(eritrocite parazitate)

Frotiul colorat cu M.G.G. permite uneori punerea în evidenţă a unor paraziţi cu localizare intraeritrocitară.

a. **Paraziţii malariei.** Protozoarele care parazitează eritrocitele în diferitele forme de malarie sînt: *Plasmodium vivax, Plasmodium falciparum* şi *Plasmodium malariae.*

În organismul uman paraziţii malariei trec printr-un ciclu extraeritrocitar şi unul intraeritrocitar. Ciclul eritrocitar este asexuat sau schizogonic; el începe odată cu pătrunderea micromerozigoţilor în eritrocite, după încheierea stadiului extraeritrocitar. Aspectul morfologic al corpusculilor parazitari din eritrocite diferă, atît după tipul de malarie, cît şi după stadiul evolutiv al ciclului. În general, în eritrocit, parazitul parcurge următoarele etape: stadiul de inel şi amibă (trofozonţi); prerozete şi rozete (schizonţi) şi stadiul de gametociţi (macro- şi microgametociţi).

Prezenţa paraziţilor malariei pe frotiul sanguin obişnuit se constată mai rar decît pe preparatele concentrate (picătură groasă). Deşi malaria este în prezent dispărută din ţara noastră, au fost semnalate cazuri în care bolnavi cu antecedente malarice foarte vechi, fără nici o simptomatologie prealabilă, prezintă (de exemplu, după o hemoragie digestivă superioară masivă datorită evacuării rezervelor sanguine din depozitul splenic) fenomene tipice de crize malarice. Aceste fenomene se explică

Scanned with OKEN Scanner

prin expulzarea în sînge a paraziților aflați în stare larvată. Tabloul sanguin în parazitarea malarică a sîngelui se caracterizează prin anemie de grade variabile, alterări morfologice ale eritrocitelor (ca dimensiuni, formă, colorabilitate) și apariția de eritrocite cu punctații bazofile și eventual de eritroblaști în sîngele periferic.

b. **Bartonella bacilliformis** provoacă boala cunoscută sub denumirea de febra de Oroya sau boala Carrion, ce duce la anemii intense prin parazitarea eritrocitelor. Parazitul apare în interiorul lor sub formă de granule mici sferice (cocciforme) sau de bastonașe, colorate în roșu intens. Boala persistă sub formă endemică, mai ales în America de Sud (verruga peruviană) (317).

c. **Piroplasma bovină (Babesia bovis)** este un parazit bovin ce poate fi transmis omului prin intermediul căpușei. El se prezintă sub formă de granule cocciforme (mici) sau ameboide (mari), rotunde sau alungite.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 4

METABOLISMUL ERITROCITAR

I. CUPLAREA METABOLISMULUI ERITROCITAR ÎN METABOLISMUL GENERAL

A. PROCESE METABOLICE CELULARE DE BAZĂ

Procesele metabolice din eritrocite urmează aceleași legi fundamentale care guvernează metabolismul tuturor structurilor celulare din natură, de la animalele sau plantele cele mai simple, pînă la celulele organismelor celor mai evoluate. Descendența comună a omului și a altor vertebrate, din organisme mult mai simple, explică faptul că reacțiile biochimice sînt identice sau foarte asemănătoare în tot ce este viu în natură. Organismele sînt porțiuni din univers, după cum același lucru poate fi spus și despre o infimă porțiune din organismul nostru, de exemplu despre eritrocit.

Între viețuitoare și mediul ambiant se desfășoară interacțiuni permanente cu reorganizări și reechilibrări, care încep din prima oră de viață a zigotului și se încheie odată cu moartea individului; la această ultimă situație se ajunge cînd reacțiile biologice naturale sînt depășite, organismul nefiind în stare să se reechilibreze funcțional. În ultimă instanță, viețuitoarele sănătoase sînt mașini biochimice bine reglate. Funcțiile vieții au la bază mecanisme de interacțiuni moleculare, care se organizează în procese metabolice. Aceste activități duc la „uzura" structurii, întrucît în univers nu există o construcție înzestrată cu calități de „perpetuum mobile".

Prin *metabolism* se înțelege totalitatea transformărilor chimice care au loc într-un organism sau în celula vie, metabolismul fiind însăși expresia vieții. Moleculele care iau parte la aceste procese se numesc metaboliți, iar totalitatea reacțiilor chimice, care rezultă din transformarea

Scanned with OKEN Scanner

moleculelor hranei, în molecule proprii celulei, reprezintă metabolismul intermediar. Viața se desfășoară din însumarea organizată a energiei specifice rezultate din activitatea fiecărei celule care alcătuiește organismul viețuitoarelor. Complexitatea extremă a proceselor metabolice cuprinde o serie de cicluri funcționale, intricate între ele, aflate într-o stare de „pendulare" care menține organismul în echilibru dinamic. După sensul proceselor, metabolismul cuprinde *anabolismul* sau metabolismul plastic — transformări rezultate din sinteze, creșteri, acumulări — și *catabolismul* sau metabolismul de întreținere — transformări inverse, în sensul descompunerii produșilor respectivi — procese ale căror reacții se petrec pe baza legii conservării energiei*. În anabolism rolul cel mai important îl dețin proteinele, iar în procesele catabolice, furnizoare de energie, importanța primă o au glucidele și lipidele. Pentru metabolismul eritrocitar sursa aproape exclusivă de energie este glucoza (163). Scopul final al metabolismului energetic este stocarea energiei în compuși macroergici și apoi decompensarea treptată a acestora cu eliberarea energiei conținute, într-un mod care să permită utilizarea ei biologică.

O succintă trecere în revistă a principalelor procese metabolice este indispensabilă pentru o bună înțelegere a patologiei eritrocitare (7, 35, 99, 143, 186, 262).

1. CONSTITUENȚII FUNDAMENTALI AI ORGANISMULUI

Compoziția chimică a corpului omenesc are, în general, compoziția naturii înconjurătoare sau a pămîntului din care provine; celulele nu conțin atomi care să aparțină în exclusivitate celulelor vii. Din cele peste 105 elemente cunoscute în univers, organismul uman conține aproximativ 60. Organismele vii sînt alcătuite, într-o proporție de circa 99%, din primele 20 de elemente ce figurează în clasificarea periodică (tabelul Mendeleev). Viața, sub forma ei primitivă, se compune din elementele cele mai răspîndite în natură: hidrogen, carbon, azot, sulf, oxigen, apoi sodiu, potasiu, calciu, siliciu, magneziu și fosfor (tabelul 4-1).

Repartizate pe substanțe organizate molecular, componentele corpului unui individ de circa 65 kg se prezintă astfel: apă 40 kg (60—70%), proteine 10 kg (15%, din care circa 2/3 enzime), grăsimi 10 kg (10—30%), glucide 1/2 kg (1%), substanțe minerale 5 kg (7—8%).

Apa este constituentul de bază al organismului; în apă se petrec cele mai importante procese fizico-chimice ale metabolismului celular. Cantitatea de apă a organismului uman variază între 50 și 95% din greutatea corporală (50% la obezi și 70% la persoanele foarte slabe); la copilul mic apa depășește 80%, iar la embrion și la făt reprezintă 90—97% din greutatea corpului (94% la fătul de 3 luni) (280). De menționat că țesutul adipos conține doar 20% apă, mai puțin chiar decît sistemul osos (fără măduvă) care conține 30% apă.

Apa organismului este repartizată, în raport cu structurile organismului, în *trei sectoare lichidiene:*

— *intracelular* sau *apa de constituție*, care reprezintă 30—40% din greutatea corporală; delimitarea acestui sector este asigurată de membrana celulară;

— *interstițial* sau *apa din sistemul lacunar*, aflată între pereții vaselor sanguine și membranele celulelor, sector ce reprezintă circa 50% din apa totală din organism (celulele organismelor „mustesc" în lichidul interstițial);

— *intravascular*, reprezentînd *apa din plasma sanguină și din limfă;* ea se găsește în interiorul arborelui circulator, limitat de pereții vaselor sanguine și limfatice; apa din sectorul circulant reprezintă circa 5% din apa totală.

Aceste trei sectoare lichidiene sînt separate între ele prin *două sisteme de membrane* semipermeabile: *membrana celulară,* care separă spațiul intracelular de

Tabelul 4-1

Compoziția elementelor la un organism de 80 kg

Nr. de ordine în tabelul periodic	Elementul (în paranteze, simbolul și greutatea atomică)	Conținutul elementului în organism		
		Procentual		În greutate absolută (kg)
8	Oxigen (O) (16)	62,43	96,54	50
6	Carbon (C) (12)	21,15		17
1	Hidrogen (H) (1)	9,86		8
7	Azot (N) (14)	3,10		2,50
20	Calciu (Ca) (40)	1,90	3,24	1,50
15	Fosfor (P) (31)	0,95		0,75
19	Potasiu (K) (39)	0,23		0,18
16	Sulf (S) (32)	0,16		0,13
17	Clor (Cl) (35,5)	0,08		0,06
11	Sodiu (Na) (23)	0,08		0,06
12	Magneziu (Mg) (24)	0,07		0,056
53	Iod (I) (127)	0,014		0,010
9	Fluor (F) (19)	0,009		0,007
26	Fier (Fe) (56)	0,005		0,0035
35	Brom (Br) (80)	0,002		0,0016
13	Aluminiu (Al) (27)	0,001		0,0008
14	Siliciu (Si) (28)	0,001		0,0008
25	Mangan (Mn) (55)	0,00005		0,00004

* Legea conservării energiei a fost formulată de Robert Meyer care a demonstrat că energia poate trece dintr-o formă în alta, suma tuturor formelor energetice rămînînd nemodificată.

cel extracelular și *peretele capilar*, care separă lichidul intravascular de cel interstițial. Astfel se realizează un sistem tricameral; substanțele nutritive, care trec din plasmă în celule, traversează două membrane și un compartiment lichidian cuprins între ele; produșii de catabolism parcurg același traseu în sens invers. Apa trece cu ușurință dintr-un compartiment în altul, în timp ce electroliții au o distribuție asimetrică de o parte și de alta a membranelor; între lichidul sanguin, lichidul intracelular și cel intercelular există un schimb permanent. Apa și sărurile reprezintă componente inseparabile în organism; relațiile lor sînt atît de strînse, încît trebuie considerate în comun, în cadrul unui „metabolism hidroelectrolitic" (194, 280).

Funcția principală a apei este solubilizarea și transportul substanțelor solide, dintre care mineralele joacă un rol foarte important. Apa este supusă și ea *disociației electrolitice* (ca și acizii și bazele), din care rezultă cationii (H^+) și anionii (OH^-); gradul de disociație a apei este însă foarte redus în comparație cu al disociației altor substanțe. În stare pură, la 25°C, concentrația ionilor H^+ și OH^- este egală, fiecare cu 10^{-7} (punctul de neutralitate); în soluții acide concentrația ionilor H^+ crește (10^{-6}, $10^{-5} \ldots 10^{-1}$), iar în soluții alcaline scade ($10^{-8} \ldots 10^{-14}$). Valorile inverse logaritmului concentrației ionilor de H^+ sînt folosite pentru exprimarea gradului de aciditate (pH între 7 și 1) sau alcalinitate (pH între 7 și 14) a unei soluții.

Scanned with OKEN Scanner

2. ENERGIA CELULARĂ

Toate celulele vii reclamă, în activitatea lor, energie pe care o extrag din degradările alimentare. Sursa energetică pentru metabolismul animal este oxidarea compuşilor organici; realizarea acestui proces necesită anumiţi compuşi organici specifici, ca vitaminele. Plantele superioare utilizează energia luminoasă (fotosinteza) reducînd CO_2 cu ajutorul clorofilei, fără să necesite prezenţa acestor compuşi (vitaminele) (194, 221).

a. **Oxidarea biologică.** Încă de la Lavoisier (1775) se afirmă că viaţa este o ardere. Atît pentru combustia într-un motor, cît şi pentru procesele vitale, termenii finali ai ecuaţiei brute de ardere sînt identici: CO_2 şi H_2O; în ambele procese se eliberează energie. Între producţia de energie în reacţii directe *in vitro* şi energia celulei vii există însă deosebiri importante; în timp ce în primul caz, de exemplu, al arderii carbonului, degajarea energiei se bazează pe oxidarea carbonului la CO_2, în biochimie acest proces joacă un rol secundar. La nivelul ţesuturilor, în procesul numit „oxidare", oxigenul molecular nu reacţionează direct cu substanţele nutritive, iar CO_2 provine, în primul rînd, din desfacerea grupărilor carboxilice ale metaboliţilor intermediari. În organismul viu (în care temperaturile sînt constante) energia necesară diferitelor reacţii reprezintă numai o parte a energiei legate a moleculei; ea provine din oxidarea hidrogenului, adică din detaşarea lui din moleculele substanţelor nutritive prin diverse reacţii enzimatice, ceea ce reprezintă substratul energetic al reacţiilor. Hidrogenul eliberat este apoi dirijat, gradat, spre oxigen cu care formează o moleculă de apă. Oxigenul deci nu participă la toate procesele de oxidare biologică, majoritatea lor se desfăşoară în absenţa oxigenului, ele fiind de fapt dehidrogenări. Hidrogenul astfel îndepărtat trebuie să fie totuşi plasat pe o altă moleculă, care în felul acesta se reduce (163, 194). Carbonul nu intervine decît ca purtător de hidrogen şi ca acceptor de oxigen. După Szent-Györgyi „hrana noastră este constituită, în ultima analiză, din hidrogen". Orice oxidare constă deci dintr-o pierdere de una sau mai multe sarcini de electricitate negativă sau din pierdere de electroni; invers, orice reducere este un cîştig de sarcini negative. Aceste reacţii se întîlnesc adesea cuplate (oxido-reducere); astfel „lanţul respirator" este realizat prin alternanţa unor reacţii (enzimatice) de reducere şi oxidare (sisteme „red-ox").

b. **Sinteza de ATP.** Un mare cîştig pentru economia celulară este realizat prin capacitatea de a nu irosi energia degajată din procesele de catabolism atunci cînd nu este necesară pentru nevoile imediate ale celulei. Organismul dispune de modalităţi care permit înmagazinarea şi păstrarea ei în alte molecule sub o formă uşor de utilizat, după necesităţi (137). Sediul obişnuit al acestor procese sînt mitocondriile, unde se produce „reîncărcarea acumulatoarelor" energetice ale celulei. Astfel o mare parte din energia provenită din alimentaţie se găseşte transformată şi depozitată ca energie potenţială sub formă de compuşi macroergici ai acidului fosforic. Furnizorul imediat al acestor rezerve de energie este acidul adenozintrifosforic (ATP), substanţă bogată în legă-

turi cu mare putere energetică (macroergică), care, prin defosforilare, își pierde fosfații labili, devenind acid adenilic (AMP); invers, acceptorul inițial de acid fosforic este acidul adenilic (nucleotid format din adenină, riboză și acid fosforic) (fig. 4-1). O moleculă de ATP poate să furnizeze circa 7 000 calorii/mol (sau 7 kilocalorii) și anume: reacția: ATP → ADP + ortofosfat eliberează prin oxidare 7 kcal/mol, iar reacția ATP → AMP + pirofosfat — 8,6 kcal/mol. Cîștigul de energie se bazează exclusiv pe defosforilarea moleculelor macroergice, de aceea procesul se numește *fosforilare oxidativă*.

Conținutul celular de ATP deși este ridicat, rezervele lui s-ar epuiza rapid dacă moleculele consumate nu s-ar reface permanent și rapid. Turn-overul ATP este foarte mare: cantitatea metabolizată în 24 de ore este de circa 70 kg ATP, ceea ce echivalează cu aproximativ greutatea proprie a organismului. În afara ATP organismul dispune și de alți compuși macroergici furnizori de energie.

În eritrocit ATP are roluri multiple: participare la fosforilarea zaharurilor (glucoză, fructoză), participare la transportul Na și K (pompa ionică); contribuție la menținerea formei discoidale a eritrocitului, legarea ATP de molecula de Hb și reducerea afinității exagerate a acesteia pentru O_2, sinteză de nucleotide purinice și pirimidinice, participare la reglarea glicolizei prin inhibarea alosterică a 6-fosfo-fructokinazei (PFK) etc. (303).

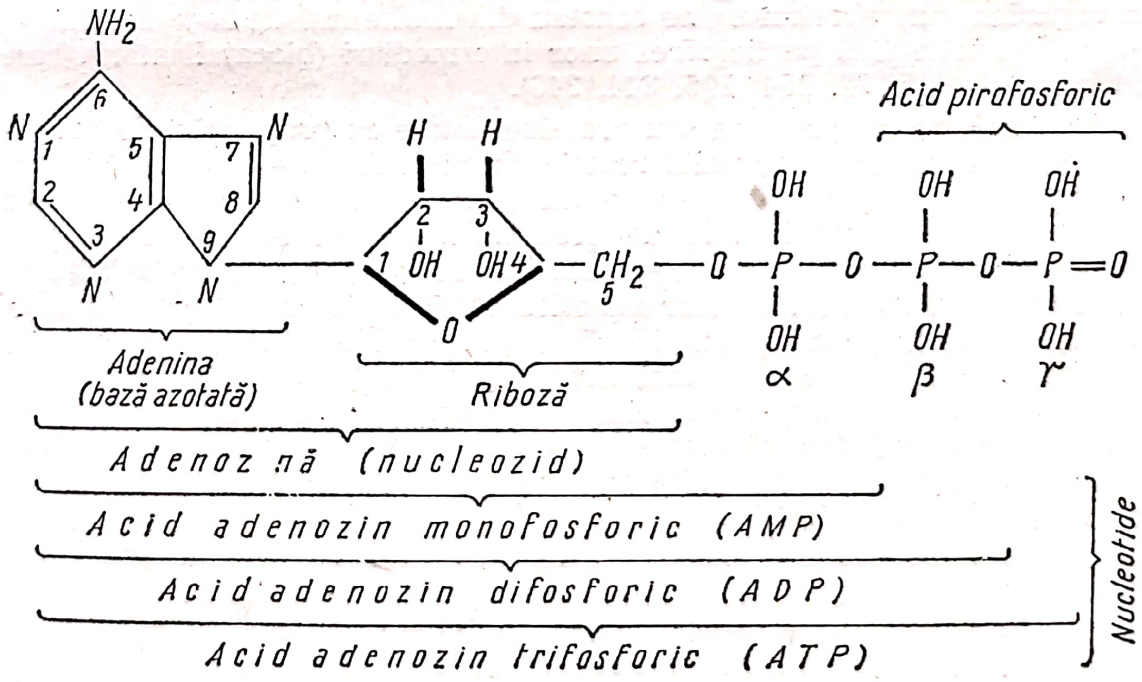


Fig. 4-1. Formula desfășurată a acidului adenozintrifosforic (ATP).
ATP acumulează rezerve importante din energia produsă în organism pe care o stochează în celulă, de aceea legăturile fosforice cu nucleozidul adeninic se numesc legături macroergice. Reacțiile au loc în dublu sens, după formula ATP ⇆ ADP ⇆ AMP. Cînd celula necesită energie pentru metabolismul ei, apelează la rezervele de ATP care se transformă în ADP, respectiv în AMP, aceasta devenind substanță energetică terminală.

Scanned with OKEN Scanner

Reacţiile biochimice ale organismului sînt de două categorii: *exergonice* sau *producătoare de energie*, bazate pe procesele de *catabolism* şi *endergonice* sau *consumatoare de energie*, bazate pe procesele de *anabolism* sau de *sinteză* (68, 81, 163), posibilă dacă li se furnizează energie din exterior (cuplare cu o reacţie exergonică).

Energia moleculară, exprimată de obicei în calorii*, variază de la o moleculă la alta în funcţie de natura şi complexitatea legăturilor chimice. Prin degradarea completă a unei substanţe nu se poate obţine mai multă energie decît cea conţinută în legăturile care unesc atomii între ei, indiferent de calea de degradare sau de numărul etapelor intermediare urmate. Fiecare corp are energia sa proprie numită *potenţial energetic* care se poate exterioriza ca *entalpie* liberă sau energie liberă (există tabele de energii libere pentru diferitele molecule) (329).

Formarea apei reprezintă principala reacţie biologică producătoare de energie şi totodată cea mai importantă cale de utilizare a oxigenului respirator. Fiecărei molecule de apă formate îi corespunde eliberarea unei energii egale cu 68 kcal/mol. Formarea apei *in vitro*, pe baza combinării elementelor, duce la o reacţie „explozivă" cu degajarea bruscă a unei mari cantităţi de energie. Pentru a evita reacţiile violente *in vivo*, energia obţinută de la diferitele substraturi este preluată în etape (ca şi cum, pentru a atenua scăderea unui torent, s-ar amenaja mai multe cascade în trepte). De aceea, în organism, oxigenul molecular nu oxidează direct, ci prin intermediul unor înlocuitori ai săi, numiţi acceptori de hidrogen (NAD, NADP etc.); fiecare treaptă, la rîndul ei, este cuplată cu o serie de alte reacţii. Prin descompunere, produşii energetici (alimente) nu iau parte directă la reacţie ci contribuie, prin transferarea potenţialului lor energetic, la formarea de produşi macroergici (ex. ATP).

c. Noţiuni de enzimologie celulară. Moleculele organismului se află într-o continuă mişcare, transformare şi reînnoire; în mod permanent se descompun şi se sintetizează diferite substanţe. Toate procesele vitale din organism (metabolismul), ce constau din multe mii de reacţii chimice, nu ar fi posibile fără participarea unor intermediari (biocatalizatori), care sînt enzimele (35, 72, 154, 195, 344, 346).

Enzimele** sînt proteine sau proteide dotate cu proprietăţi de activitate specifică pentru o anumită reacţie chimică. Aparatul chimic al unei celule conţine un mare număr de enzime. Din totalul proteinelor din organism (care la un individ de greutate medie se evaluează la circa 10 kg), aproximativ 2/3 sînt reprezentate de enzime. Aceste substanţe, sintetizate pe baza informaţiilor genetice, au calitatea de a degrada anumite substanţe în produşi mai simpli, sau invers, de a sintetiza substanţe mai complexe din precursori mai simpli. În lipsa lor, unele reacţii, chiar din cele mai elementare, ar necesita temperaturi înalte, reactivi puternici şi timp îndelungat, factori incompatibili cu viaţa; sub acest aspect, prin intermediul enzimelor se realizează o mare economie de energie pentru organism (19, 117, 163, 280).

Enzimele catalizează constant acelaşi tip de reacţie; între enzimă şi Anlestratul ei există o specificitate strictă. Există însă anumite enzime care pot acţiona asupra unei clase întregi de substanţe cu constituţie chimică asemănătoare (128). Ca mod de acţiune enzima slăbeşte legăturile atomice stabile ale moleculei prin ionizarea moleculei în zona spe-

---

* O calorie=energia necesară pentru a ridica temperatura unui gram de apă cu 1°C (de la 14,5 la 15,5°C); kilocaloria (Kcal)=1 000 calorii.

** Derivat de la cuv. gr. *zymos*=levură; cuvintele fermenţi sau diastaze nu se mai utilizează ca sinonime pentru reacţiile celulare.

Scanned with OKEN Scanner

cificității, realizînd scindarea ei sau introducerea unei grupări moleculare noi; legarea enzimelor de substratul lor se face prin legături slabe.

Enzimele fiind catalizatori („îndrumători") ai reacțiilor, nu participă stoechiometric în reacția cu substratul și, în consecință, nu-și schimbă (cel puțin teoretic) structura; pentru aceasta își „deleagă" la reacție un „asociat" nespecific, coenzima (în cazurile în care acționează prin intermediul ei). De aceea cantitatea enzimelor este de obicei infimă, în contrast cu diversitatea lor foarte mare; în consecință în testările curente nu se dozează enzima însăși, ci activitatea ei asupra substratului. O investigație completă ar trebui să aibă, în acest sens, două faze: constatarea activității enzimatice și identificarea, izolarea și cercetarea proprietăților fizico-chimice ale enzimei care a dus la această activitate.

Tipuri de reacții enzimatice (103). Principalele reacții biochimice care rezultă în urma intervențiilor enzimatice sînt următoarele:

— *oxidarea* și *oxidoreducerea* se realizează prin adaus sau sustragere de atomi de hidrogen (dehidrogenare);

— *decarboxilarea* (oxidativă și neoxidativă) constă în desprinderea grupărilor cu ajutorul decarboxilazei, cu formare de CO_2, iar *carboxilarea* constă în adăugarea de CO_2;

— *fosforilarea* (de ex. prima etapă din seria reacțiilor de metabolizare a glucozei) constă în legarea unui radical fosfat (în exemplul dat, cu ajutorul hexokinazei);

— *dezaminarea* reprezintă eliminarea unei grupări $—NH_2$, iar *aminarea* este procesul invers; *transaminarea* reprezintă transferul unei grupări aminice de la un aminoacid la altul;

— *hidroliza* reprezintă scindarea unei molecule cu adausul unei molecule de apă; una din moleculele rezultate primește radicalul —H, iar cealaltă — radicalul —OH;

— *condensarea* reprezintă combinarea a două sau mai multe molecule de același fel (de obicei cu eliminarea unei molecule de apă sau a unei alte molecule mici).

Enzimele sînt substanțe proteice cu o greutate moleculară variabilă (30 000—1 000 000). Pînă în prezent se cunosc cel puțin 1 000 de enzime, dintre care circa 400 au fost obținute în stare cristalină pură (tripsina, pepsina, papaina etc.), iar unui număr important din acestea li se cunoaște structura chimică primară și dispoziția lor spațială (de exemplu a lizozomului); la altele se cunosc doar unele porțiuni din lanțul polipeptidic. O anumită zonă din complexul structural al moleculei reprezintă *centrul activ al enzimei* care poartă răspunderea acțiunii metabolice; uneori acest centru activ este un metal (Fe, Zn, Mg etc.).

Numeroase enzime sînt complexe moleculare putînd fi fracționate în două porțiuni: una macromoleculară, proteică, nedializabilă, numită *apoenzimă* și alta micromoleculară, dializabilă, neproteică, adesea cu structură de nucleotid, numită *coenzimă*, ansamblul lor constituie *holoenzima*.

Coenzimele sînt de natură variabilă; unele sînt ușor disociabile, iar altele sînt foarte intim legate de apoenzimă (adevărate grupări prostetice). Acest intermediar dintre enzimă și substrat devine purtătorul (acceptorul sau donorul) unui atom, electron sau grupare moleculară simplă (—H, —OH, $—NH_2$, $—CH_3$ etc.), pe care le trece de pe un substrat pe altul. Coenzimele primesc hidrogenul numai dacă acesta este „slăbit" de pe substratul lui de către o proteină activatoare specifică (enzima) care mărește tendința atomilor de H de a se elibera. Deoarece acești intermediari preiau și cedează hidrogenul de pe un substrat pe altul, ei ar mai putea fi considerați „metaboliți de transport" sau „cosubstrate".

Substratul și coenzima acționează stoechiometric (nu catalitic ca enzima). Spre deosebire de enzime, care au o specificitate strictă, coenzimele sînt prezente, sub aceeași formă, în numeroase reacții biologice, constituind, în această calitate, un element de legătură între enzime și substratele lor; de aceea ele au fost ase-

Scanned with OKEN Scanner

muite cu „articulații" detașabile, prin intermediul cărora este posibil schimbul de materie, „moneda de schimb" fiind, în exemplul citat anterior, hidrogenul.

Există relații foarte strînse între coenzime și vitaminele din grupul B. Din punct de vedere al structurii lor chimice, unele din ele sînt nucleotide simple sau duble cu una, două sau trei molecule fosfat, baza lor azotată fiind mai variabilă decît la nucleotidele care intră în structura acizilor nucleici. Numeroase baze azotate, din complexul mono- sau dinucleotidic al coenzimelor au structura uneia din vitaminele B. De exemplu, în NAD sau NADP — care sînt coenzimele cele mai răspîndite din organism — au una din cele două baze azotate, vita-

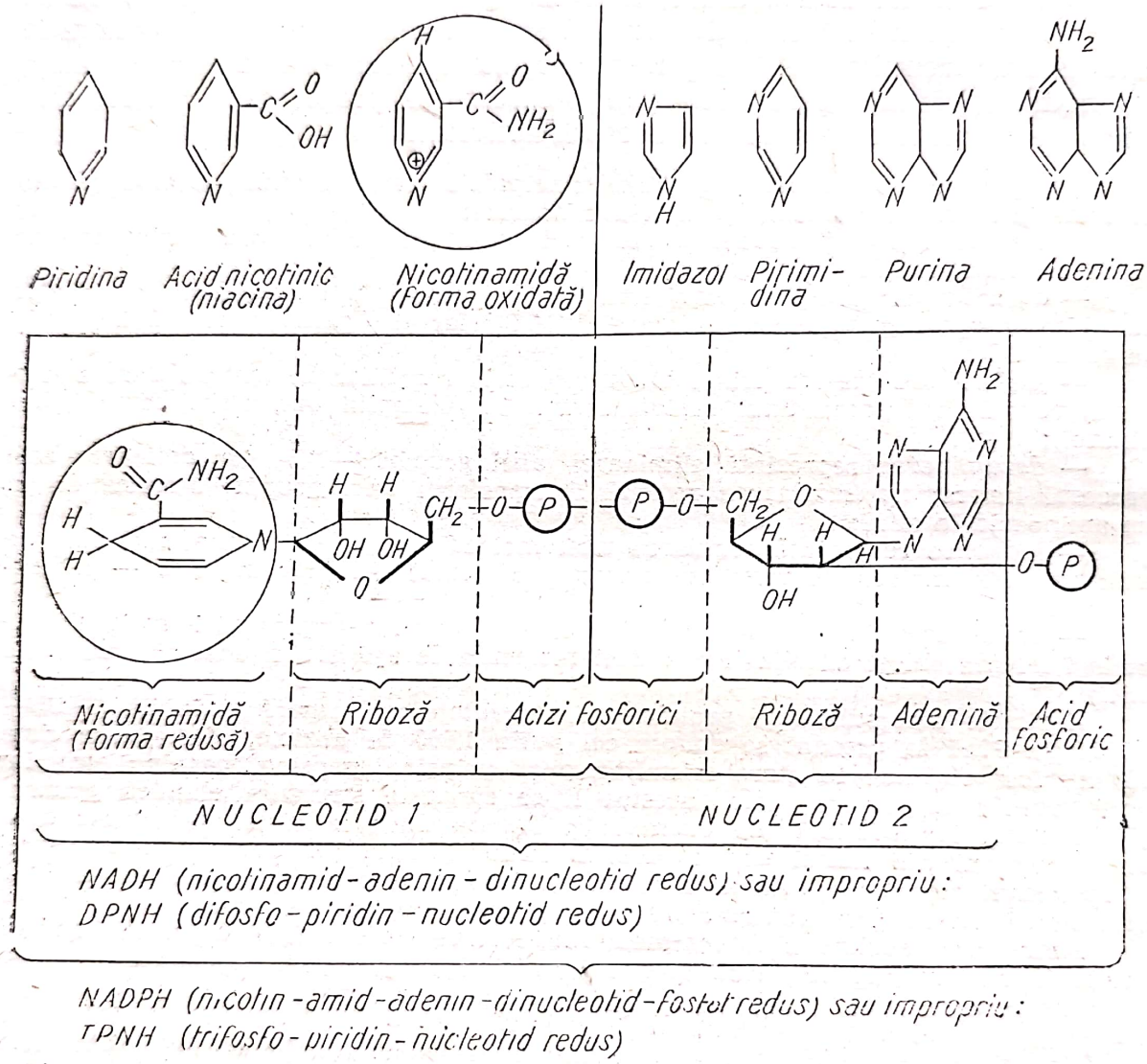


Fig. 4-2. Formulele chimice desfășurate ale coenzimelor NADH și NADPH. În cercurile mari sînt redate formele oxidată și redusă a nicotinamidei (vitamina PP). Sus, dreapta: pirimidina (heterociclu monoazotat) și purina (dublu heterociclu tetraazotat pirimidin-imidazolic). Acest „grup prostetic", cu o acțiune nespecifică, cuplat cu anumite apoenzime (protein-enzime) intervin în reacții a căror specificitate de substrat este decisă de apoenzimă.

mina PP (amina acidului nicotinic) (fig. 4-2). Alte coenzime capabile să transfere hidrogenul sînt flavinele (sau coenzimele galbene), care sînt de asemenea mono- sau dinucleotidice și a căror bază azotată este riboflavina sau vitamina B_2.

Ciclul Krebs (ciclul tricarboxilic sau ciclul acidului citric) reprezintă un sistem enzimatic complex cu un mare randament caloric în al cărui circuit intră molecule simple provenite din cele trei substanțe alimentare de bază; glucide, lipide, proteine, după ce, pe calea catabolismului, au ajuns la o formă comună,

simplă, care reprezintă materia primă pentru realizarea a numeroase procese metabolice de bază. În acest fond metabolic comun, este greu de stabilit provenienţa exactă a fragmentelor moleculare. Elementele de bază ale ciclului tricarboxilic sînt reprezentate de doi precursori simpli, unul cu 2 atomi de C (acidul acetic) şi altul cu 4 atomi de C (oxalacetatul). Din condensarea lor rezultă un produs cu 6 atomi de C, acidul citric. Aceste reacţii sînt iniţiate de CoA, ce se leagă de acetatul activ formînd acetil coenzima A. Din acidul citric rezultă atît produşi intermediari, de care „se serveşte" celula după necesităţile ei metabolice, cît şi produşi macroergici, furnizori de energie (ATP, FAD) (139, 194) (fig. 4-3 şi 4-4).

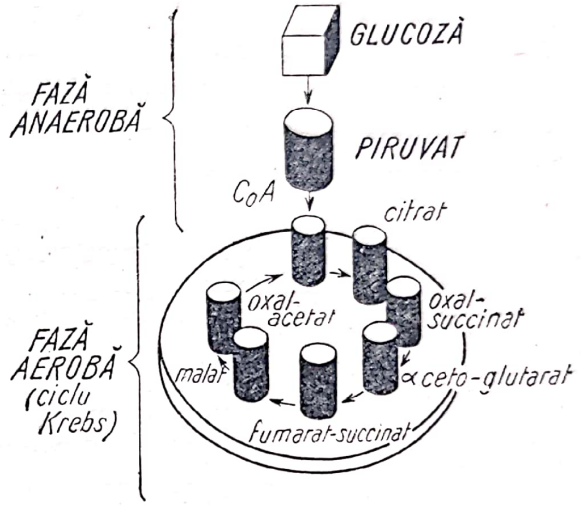


Fig. 4-3. Reprezentare figurativă a celor două faze ale degradării glucozei: faza anaerobă (glicoliza sau ciclul Embden-Meyerhof) şi faza aerobă (ciclul acidului citric sau ciclul Krebs) (modificat după rev. Sem. Hôp. Paris, lab. Rolland).

Pe „placa turnantă" sînt reprezentaţi produşii intermediari ai ciclului Krebs, avînd ca punct de plecare oxal-acetatul; aceştia sînt „convertiţi" din unul în altul pînă se revine tot la stadiul de oxal-acetat.

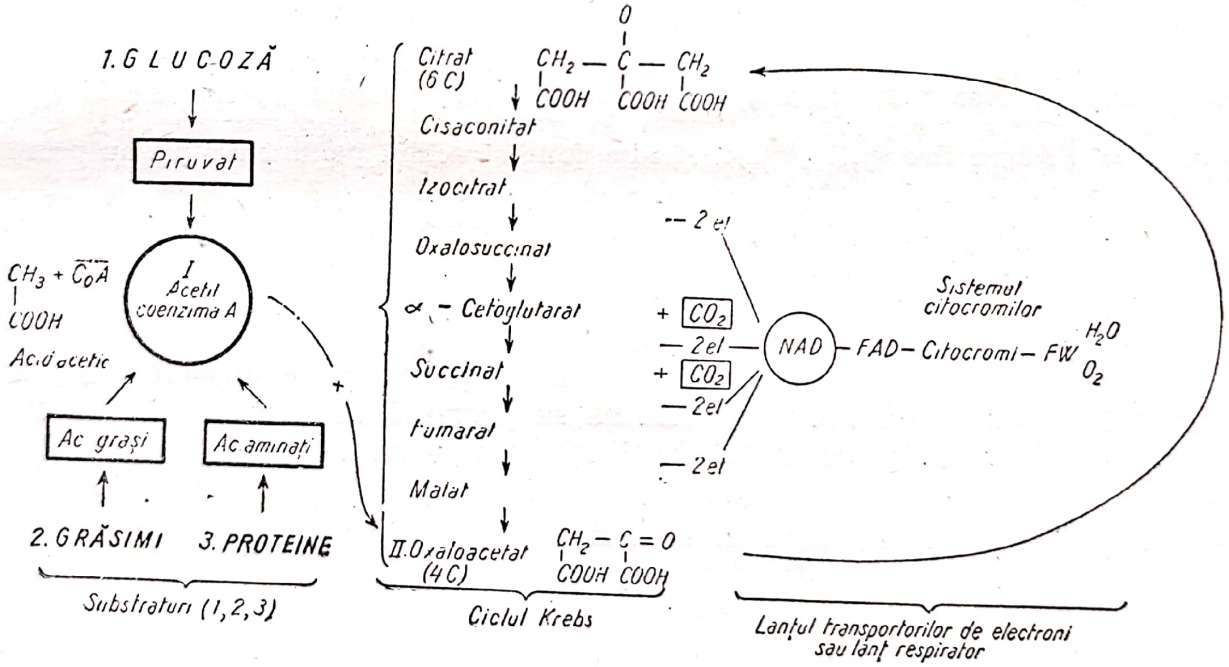


Fig. 4-4. Schemă simplificată a compuşilor intermediari ai ciclului Krebs şi a transportorilor lanţului de transfer de electroni (sistemul citocromic) (modificat după A. Gajdos, 1967).

„Startul" acestor reacţii îl dă coenzima A care se leagă de radicalul acidului acetic (moleculă cu 2 atomi de carbon) din care rezultă acetil-coenzima A. Acidul acetic rezultă din numeroase surse (degradarea glucidelor, lipidelor, proteinelor). El se combină cu un produs dicarboxilic, oxalacetatul, format din 4 atomi de carbon. Din fuziunea lor rezultă un produs format din 6 atomi de carbon, un acid tricarboxilic (acidul citric). Acesta este readus, de-a lungul unui şir de 9 reacţii, la compusul iniţial (oxalacetatul), după care ciclul reîncepe. Din aceste reacţii se obţin (din acidul acetic cu participarea apei) 8 atomi de H şi 2 molecule de CO_2, care sînt produşii finali ai metabolismului aerob, după formula: $CH_3—COOH + 2H_2O = 2CO_2 + 8H$. Lanţul respirator se cuplează, printre altele, cu acceptorul de hidrogen NAD; în urma acestui ciclu se produce o cantitate importantă din această enzimă redusă (NADH), precum şi FAD, ferment Warburg etc.

Scanned with OKEN Scanner

B. VITAMINE CU ROL ÎN ERITROPOIEZĂ

Vitaminele sînt substanţe organice cu rol de catalizatori pentru întregul regn animal. Avînd în vedere că nu pot fi sintetizate de organism, ele trebuie să fie preluate din mediul înconjurător prin alimentaţie. Originea exogenă a vitaminelor se menţine chiar în cazurile în care acestea sînt sintetizate de flora intestinală proprie (de exemplu, unele vitamine din complexul B, vitamina K), lumenul intestinal fiind considerat ca ţinînd de mediul extern. Asemenea hormonilor şi enzimelor, vitaminele au rol biocatalizator indispensabil în numeroase procese metabolice. În general, vitaminele acţionează în cuplu cu enzimele (apoenzimele) ele avînd rol de coenzime (103).

Iniţial s-a crezut că „vitaminele" sînt substanţe azotate („amine vitale"). Deşi s-a constatat că numeroase vitamine nu conţin azot (vitaminele A, C, K etc.), denumirea s-a păstrat în continuare.

Pînă în prezent nu avem încă o clasificare satisfăcătoare a vitaminelor. Cea mai uzitată este gruparea vitaminelor în „lipo-" (vitaminele A, D, E şi K) şi „hidro-" solubile (vitaminele din complexul B şi vitamina C). Dintre vitaminele hidrosolubile, grupul vitaminelor B cuprinde numeroşi biocatalizatori, care se deosebesc între ei ca structură chimică, provenienţă, mod de acţiune etc. Aceste vitamine sînt vitamina B_1 (tiamina), vitamina B_2 (riboflavina), vitamina PP (nicotinamida), vitamina H (biotina), vitamina B_6 (piridoxina), vitamina B_{12} (ciancobalamina), acidul folic.

O altă clasificare a fost sugerată de acţiunea principală a vitaminei sau a locului unde a fost dozată: vitamina K=*Koagulations Vitamin*, vitamina H (cuv. germ. *Haut*=piele), vitamina P dozată în ardei (cuv. maghiar=*paprika*), vitamina PP=„*Pelagre Preventing*" etc. Acidul folic şi acidul pantotenic nu au primit nici un simbol.

1. ACIDUL FOLIC (pteroilglutamic)

a. Structura chimică a acidului folic şi a coenzimelor folice. Acidul folic* este o vitamină hidrosolubilă ce se prezintă sub formă de pulbere cu cristale galbene. Denumirea ei ştiinţifică este de *acid pteroilglutamic*** (fig. 4-7).

După descoperirea unor anemii megaloblastice nebiermeriene, corectabile cu hidrolizate de drojdie, s-au descris o serie de factori care corectau anemia la animalele carenţate (maimuţe) sau favorizau creşterea animalelor tinere — pui de găină, sau a unor bacterii ca *Lactobacillus casei* (vitamina M, Bc, B_{10}, factor L, C, etc.) care ulterior s-au dovedit a fi derivaţi ai acidului folic. Conform recomandării IUPAC***, acidul folic reprezintă denumirea generică a întregii clase a acestor compuşi, iar sub termenul de folaţi se înţeleg compuşii biologic activi.

---

* Cuv. lat *folia*=frunză (iniţial acidul folic a fost extras din frunzele de spanac).

** Cuv. gr. *pteros*=aripă (unii din derivaţii de pteridină au fost izolaţi din aripile fluturilor).

*** International Union of Pure and Applied Chemistry.

Scanned with OKEN Scanner

b. **Ciclul metabolic al folaţilor.** Organismul uman este incapabil de a sintetiza acidul folic; el este dependent de aportul alimentar al folaţilor (139). Folaţii au o mare răspîndire în regnul vegetal şi animal. Cele mai importante surse alimentare sînt vegetalele proaspete ca drojdia, unele zarzavaturi. O mare parte din folaţii alimentari sînt distruşi în

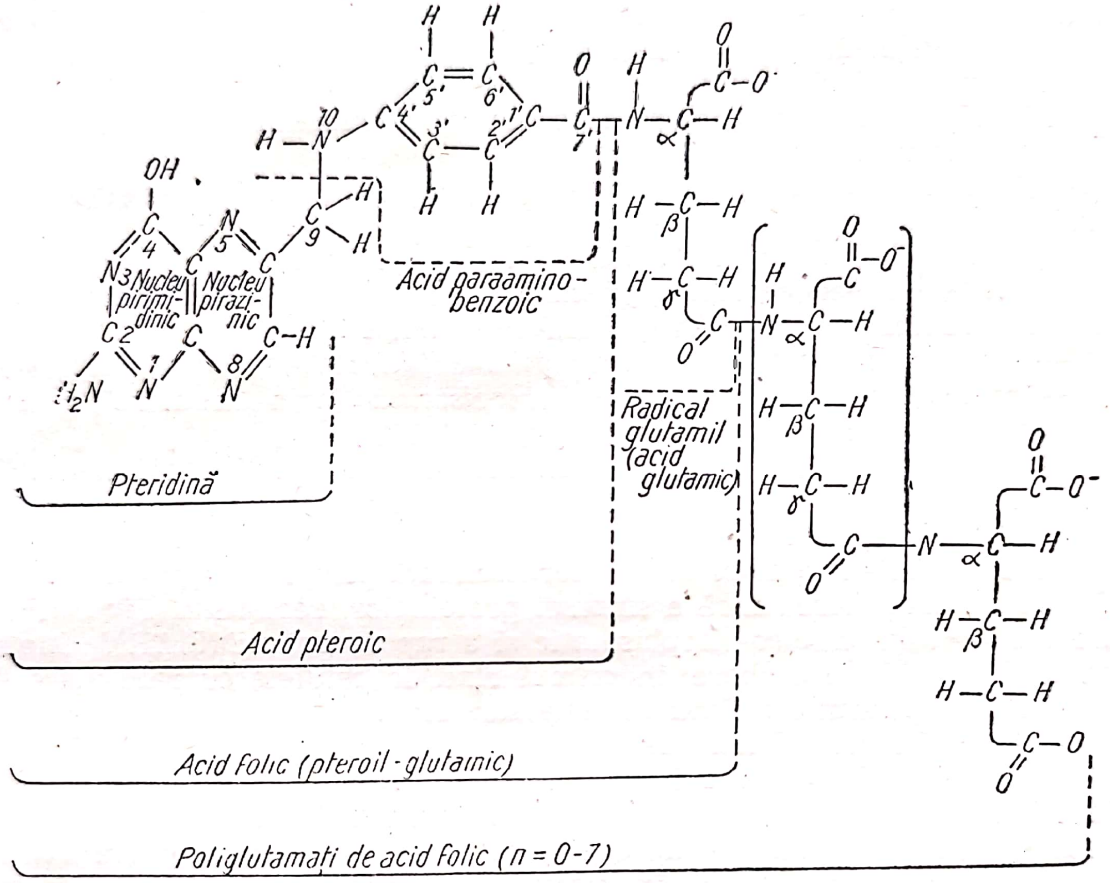


Fig. 4-5. Structura acidului folic şi a poliglutamaţilor săi (modificat după Bernstein, 1970).

Acidul folic este alcătuit din trei „fragmente": acidul pteroic, acidul p.a. benzoic şi un număr de glutamaţi. Molecula de pteridină rezultă din fuziunea unui heterociclu pirimidinic (1,3 diazină), cu altul pirazinic (1,4 diazină). Pteridina, împreună cu acidul paraaminobenzoic, formează acidul pteroic. Derivaţii acidului pteroilglutamic, cu mai multe resturi de glutamat, se numesc poliglutamaţi sau forme conjugate (di-, tri-, ... hexa- şi heptaglutamaţi).

cursul preparării alimentare; ei se pot pierde în proporţie de 50—90%; de exemplu laptele (care conţine circa 50 μg folaţi la litru) pierde circa 80% după o fierbere de 5 minute.

Nevoile zilnice de acid folic nu sînt încă bine cunoscute din cauza formelor diferite sub care folaţii se găsesc în alimente. Necesităţile zilnice de folaţi sînt evaluate la 50—100 μg/zi. Folaţii se absorb din duoden şi jejun în circulaţia portală de unde sînt vehiculaţi la nivelul ţesuturilor. În cursul traversării ficatului ei suferă anumite transformări suplimentare. Depozitarea folaţilor are loc în numeroase ţesuturi. Organele cele mai bogate în folaţi sînt ficatul şi rinichii. În bolile de ficat (ciroză),

cantitatea de folaţi de la nivelul ficatului scade apreciabil. O cantitate considerabilă de folaţi sintetizată de bacteriile intestinale se excretă prin scaun, întrecînd cu mult cantitatea ingerată. Eritrocitele conţin şi ele o cantitate apreciabilă de folaţi evaluată la 160—640 mg/ml.

Acidul folic are o importanţă metabolică vitală pentru organism, prin transferul radicalilor monocarbonaţi pe care îl îndeplineşte molecula de acid pteroil-monoglutamic redus (FH_4), care fixează labil grupările de carbon la nivelul N_5 şi N_{10}, în calitate de coenzimă. Combinaţia cu anumite enzime conferă reacţiilor specificitatea de substrat (fig. 4-6). Coenzimele folice îndeplinesc numeroase tipuri de reacţii metabolice; dintre acestea unele intervin:

a) în *sinteza bazelor* purinice şi a bazei pirimidinice, timina care intră în sinteza acizilor nucleici (ADN şi ARN) (fig. 4-7);

b) în *metabolismul unor acizi aminaţi* şi anume:

— în *formarea acidului glutamic* din acidul formiminoglutamic (FIGLU), rezultat din degradarea histidinei (fig. 4-8);

— în *transformarea serinei din glicină* (glicocol) şi invers (fig. 4-9);

— în *sinteza metioninei din homocisteină* (prin metilare), reacţie enzimatică mediată de o coenzimă B_{12} (fig. 4-10).

În deficitul de acid folic (ca şi în deficitul de vit. B_{12}), sinteza ADN este mai mult afectată decît aceea a ARN, din cauza afectării sintezei acidului timidilic, component exclusiv al ADN. Blocarea acestei reacţii duce la instalarea megaloblastozei, caracterizată prin tulburarea diviziunii celulare cu menţinerea încă a sintezei proteinelor, rezultatul fiind o scădere a raportului nucleo-citoplasmatic şi a raportului ADN/ARN). Modificarea megaloblastică apare, în primul rînd, la celulele cu rată mare de diviziune, pe primul loc fiind celulele sanguine.

Tulburările prin deficit de acid folic pot avea la bază o lipsă reală de folaţi (aport alimentar deficitar, tulburări de absorbţie) sau un deficit „funcţional" (cu tulburări de utilizare), în care sînt blocate una sau mai multe din reacţiile descrise, de exemplu, în deficitul de vitamină B_{12}, în tratamentul cu antifolice şi, în măsură mai mică, în alcoolism, infecţii etc. S-au descris în ultimul timp şi cazuri, foarte rare, de deficit ereditar al unor enzime ale metabolismului folic (formiminotransferaza, N_5-metiltransferaza şi altele). Un alt mecanism al deficitului de acid folic poate fi şi consumul crescut (mai ales în sarcină, anemii hemolitice şi alte stări cu hematopoieză crescută), care se combină adesea cu alte mecanisme (aport scăzut etc.).

c. **Metode de evidenţiere a deficitului de acid folic.** Din cauza cantităţilor foarte mici de folaţi în sînge (miimi de micrograme/ml) şi a lipsei lor de stabilitate, dozarea prin metode biochimice obişnuite nu este adecvată, în mod curent fiind utilizate *metodele bacteriologice*. Acestea folosesc microorganisme a căror creştere este dependentă de folaţi. În principiu, se prepară medii de cultură care conţin toţi factorii necesari creşterii microorganismelor, cu excepţia acidului folic. În raport cu cantitatea de folaţi din materialul testat (ser sau hemolizat de sînge total), creşterea microorganismului va atinge nivele diferite, traduse prin grade corespunzătoare de turbiditate, determinabile fotometric. Pentru deter-

Scanned with OKEN Scanner

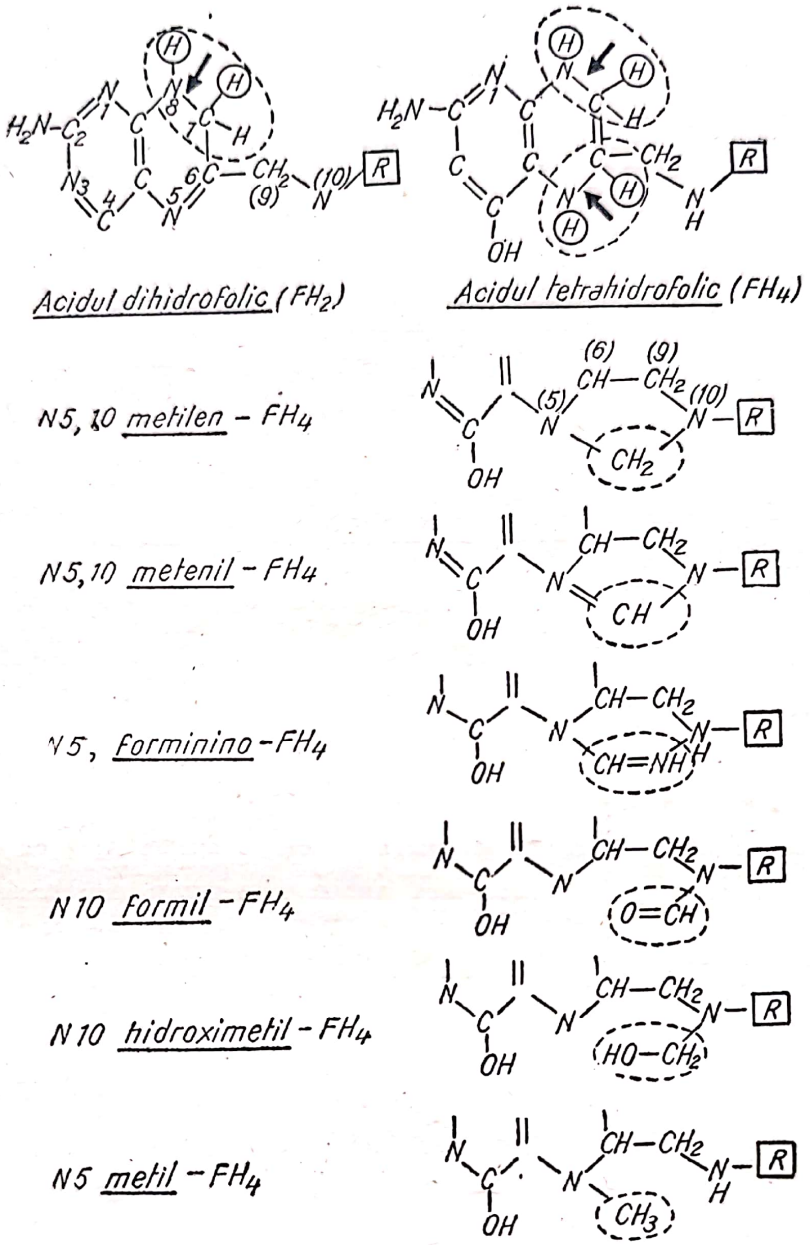


Fig. 4-6. Formele active de folaţi şi coenzimele folice.

Molecula de acid folic, deşi mult mai stabilă, este biochimic inactivă. Pentru a deveni activă ea pierde două din cele 5 duble legături ale dublului heterociclu pteridinic. Prin dispariţia dublei legături (—C=N—) de la poziţia 7—8, acidul folic redus cîştigă 2 atomi de H şi devine *acid dihidrofolic* (FH_2), iar prin dispariţia dublei legături de la poziţia 3—6 cîştigă alţi 2 atomi de H devenind *acid tetrahidrofolic* (FH_4), reacţii mediate de *dihidrofolat reductază*. NAD şi NADP (respectiv NADH şi NADPH) preiau sau predau H necesar acestor reacţii.

Coenzimele folice sînt derivaţi ai FH_4 care, legaţi de enzime specifice, au rolul de a accepta (la nivelul poziţiei N_5 sau N_{10} sau a ambelor), sau de a dona altor molecule, grupări activate de „un carbon" utilizate în diverse procese metabolice (biosinteze). În reacţiile de transfer, tetrahidrofolatul fixează labil una din următoarele grupări monocarbonice: formil (—CH=O), hidroximetil (—CH_2—CH), formimino (—CH—NH_2), metenil (=CH—), metilen (—CH_2) sau metil (—CH_3) pe care o trece reversibil de la un substrat (donator) la altul (acceptor). Gruparea amino- din poziţia 2 a nucleului pteridinic are rolul de a ataşa coenzima de enzima cu care se cuplează (apoenzima).

Scanned with OKEN Scanner

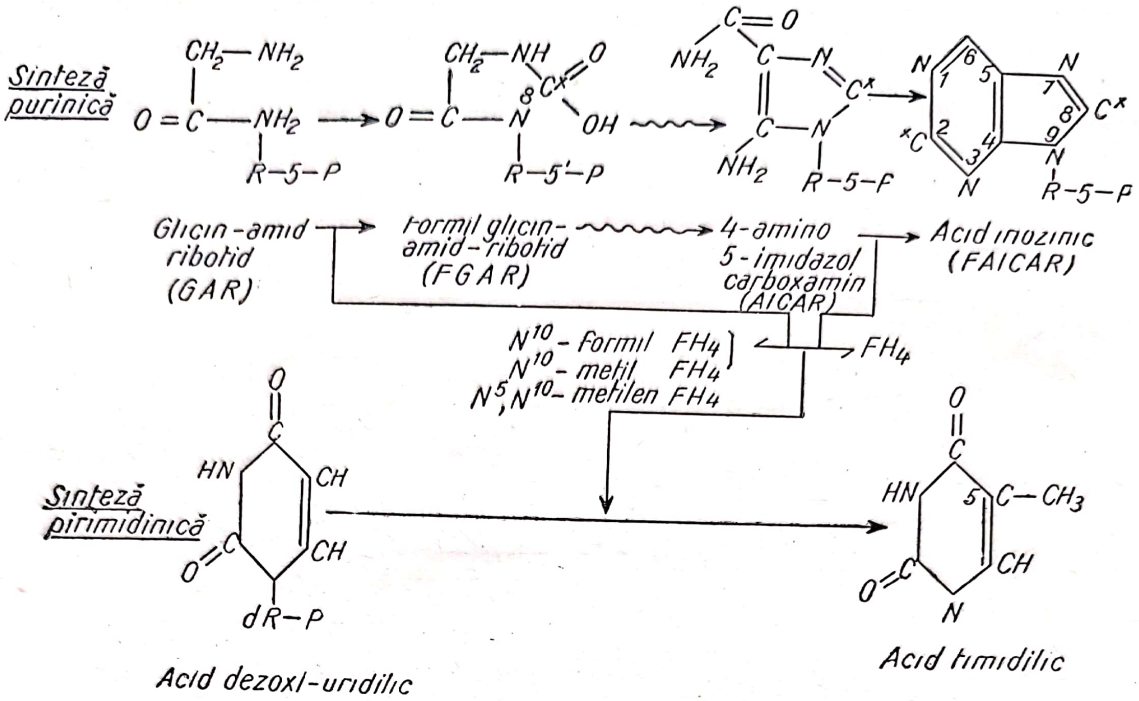


Fig. 4-7. Intervenţia acidului tetrahidrofolic (FH_4) în transportul unităţilor de „un carbon"; metil ($—CH_3$), metilen ($=CH_2$) şi formil ($—CH=O$), în biosinteza nucleului purinic şi pirimidinic (timina) (după R. Wolf, 1967).

În *sinteza bazelor purinice* — (adenina şi guanina, prezente atît în ARN cît şi în ADN) — coenzimele folice intervin în transformarea GAR şi FGAR (introducerea în nucleul purinic a C din poz. 8), precum şi în transformarea AICAR în FAICAR (introducerea în nucleul purinic a C din poziţia 2).

În *sinteza bazelor pirimidinice* — (citozina, comună pentru ARN şi ADN, iar uracilul prezent în ARN şi timina în ADN) — coenzimele folice intervin în metilarea, în poz. 5 a acidului dezoxiuridilic, cu formare de acid timidilic. Blocarea reacţiei, prin deficit de acid folic, duce la apariţia megaloblastozei. (Vit. B_{12} acţionează în acelaşi sens). Tratamentul cu antifolice (metotrexat) acţionează prin blocarea competitivă a acestei reacţii (blocarea metilen FH_4), foarte importantă în diviziunea celulară. (C^x=atom de carbon introdus în moleculă; R-5-P= ribozo-5-fosfat).

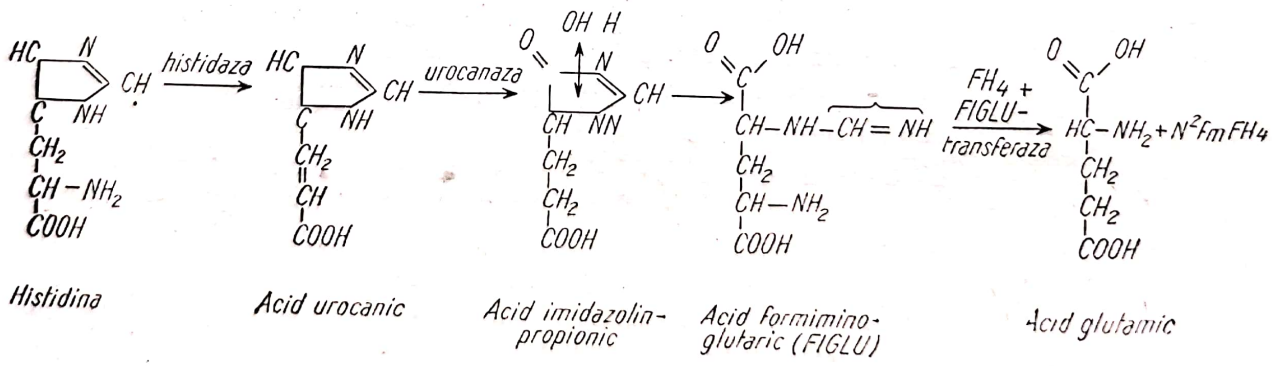


Fig. 4-8. Etapele degradării histidinei în acid glutamic (după R. Wolf, 1967)

În lipsa acidului folic, ciclul se opreşte la nivelul FIGLU; acest metabolit este eliminat prin urină în cantităţi crescute; determinarea acestei eliminări se foloseşte ca test pentru punerea în evidenţă a carenţei de acid folic după o încărcare prealabilă a organismului cu histidină (fm=formimino (—CH—NH).

minarea concentraţiei de folaţi se interpolează valorile de turbiditate pe o curbă standard obţinută cu concentraţii cunoscute de acid folic. Capacitatea microorganismelor folio-dependente de a metaboliza diferite forme de folaţi, este variabilă. În mod obişnuit este utilizat *Lactobacillus casei* care utilizează toate formele de folaţi (redusă sau neredusă, mono-, di-

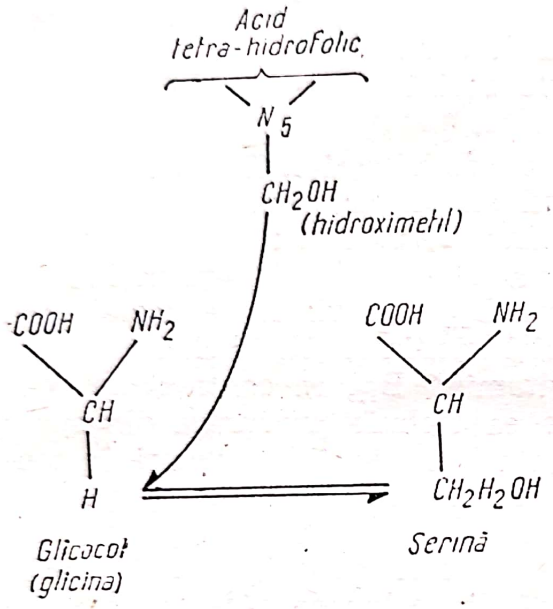


Fig. 4-9. Transformarea glicocolului în serină.

Transformarea se realizează prin transferul unui radical hidroximetil (—CH_2—OH) de pe N_5-hidroximetil FH_4 la glicocol şi invers. Reacţia este mediată enzimatic (dehidroximetilază) în prezenţa NAD, respectiv NADH În deficitul de acid folic sau vit. B_{12}, administrarea glicocolului agravează megaloblastoza.

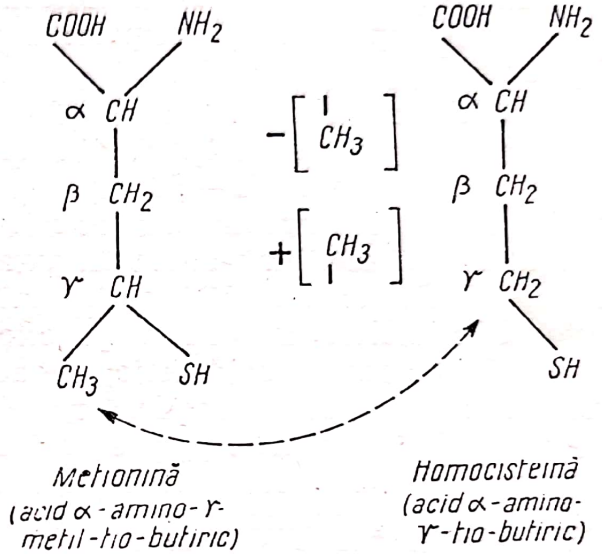


Fig. 4-10. Transformarea homocisteinei în metionină şi invers.

Această reacţie a acidului tetrahidrofolic se efectuează exclusiv prin intermediul vit. B_{12} care are rol de coenzimă. Metionina este un donator de metil; demetilată, metionina devine „homocisteină". Singura cale de regenerare a acidului tetrahidrofolic liber (FH_4) din metil-FH_4 este reacţia de metilare a homocisteinei în metionină. Transferul grupului metil este cedat întîi vit. B_{12}, care joacă rol de intermediar, iar de la aceasta la homocisteină. În lipsa vit. B_{12} se acumulează în organism folat inactiv (sub formă de metil FH_4) ducînd la concentraţia de folaţi prin tulburare de utilizare („folat blocat în capcana metil-folatului"). Blocarea ei explică megaloblastoza prin defectul acestei sinteze.

şi triglutamice), cu excepţia poliglutamaţilor. *Pediococus cerevisae (leuconostoc citrovorum)* nu poate utiliza decît formele active de folat (FH_4 şi derivaţii săi, cu excepţia formei FH_4-metil). *Streptococcus faecalis* are un „spectru" intermediar din care, de asemenea, este exclusă forma FH_4 metil).

Proba de încărcare cu histidină (testul FIGLU) este întrebuinţată pentru evidenţierea deficitului de folaţi, deşi în ultima vreme specificitatea ei este tot mai contestată. Ea se bazează, în principiu, pe faptul că în deficitul de folaţi catabolizarea histidinei se opreşte la nivelul acidului form-imino-glutamic (Fi-Glu), care se elimină în urină ca atare. Obişnuit se foloseşte administrarea unei doze unice de 15 g de histidină per os

Scanned with OKEN Scanner

și determinarea cromatografică a cantității de FIGLU în urină din următoarele 24 de ore. În aceste condiții se elimină peste 35 mg/24 de ore (normal — sub 25 mg) (218), (fig. 4-8).

2. VITAMINA B_{12} (ciancobalamina)

a. **Structură chimică.** Vitamina B_{12} este o substanță cu greutatea moleculară de 1 355 și cu o rază moleculară de 8 Å. Molecula este alcătuită din două componente principale: o parte corinică și una nucleotidică (fig. 4-11).

b. **Ciclu metabolic.** Necesitățile zilnice de vitamină B_{12} par a fi de 2,50 μg pe zi; ele se acoperă din aportul alimentar care furnizează, în medie, o cantitate de 10—50 μg pe zi. Anumite alimente (ficat, moluște) conțin cantități considerabile de vitamina B_{12} (100 μg% sau mai mult). Alimentele cu conținut bogat în vitamina B_{12} sînt viscerele, mezelurile, peștele și altele; cantități ceva mai mici conțin ouăle, brînzeturile și laptele. Vegetalele nu conțin, practic, vitamină B_{12}, în contrast cu conținutul lor bogat în acid folic; de aceea ea trebuie procurată din surse animaliere. Regimurile vegetariene stricte au dus, în unele cazuri, la megaloblastoză. Vitamina B_{12}, preluată din hrană prin regim carnat, nu este sintetizată de către organismele animalelor consumate; ele o procură pe seama microorganismelor saprofite de unde este depozitată în mușchii și viscerele proprii. Deși flora microbiană din colon se găsește în cantitate mare, se pare că vitamina B_{12}, sintetizată de aceasta, nu este utilizabilă. Ierbivorele își procură vitamina B_{12} din microorganismele saprofite ale plantelor. Alte animale, ca păsările, unele rozătoare, obțin vitamina prin coprofagie.

Sursa de vitamină B_{12} pentru preparatele terapeutice. Primele cantități de vitamina B_{12} au fost obținute din ficatul animalelor (aproximativ 1 mg de vitamină dintr-o tonă de viscere). Unul din microorganismele furnizoare de mari cantități de vitamină B_{12} este *Streptomyces griseus.* Ea se obține, pentru nevoile comerciale, în cursul preparării streptomicinei, prin extragerea din reziduurile în care au fost cultivate aceste bacterii. Calea aceasta este extrem de economică: dintr-un litru de material de fermentație se extrag 24 mg de vitamină; ea este apoi cristalizată. Cristalele, de culoare roșie închis, se dizolvă rapid în soluție apoasă.

În afară de vegetarienii totali (care refuză, nu numai carnea, ci și laptele, ouăle etc.) și de copiii nou-născuți debili, hrăniți cu lapte de capră, este practic exclusă avitaminoza B_{12} prin deficit de aport. În cazurile de carențe alimentare grave pot apărea însă semnele dificitului de vitamină B_{12} cu asocierea carenței de fier, proteine și altele. În aproape totalitatea cazurilor, deficitul de vitamina B_{12} provine din tulburarea absorbției acesteia prin mucoasa intestinală (ileon), datorită absenței factorului intrinsec, fixatorul vitaminei B_{12}, secretat de mucoasa gastrică, care vehiculează vitamina B_{12} din sursele alimentare în circulația sanguină (80).

Scanned with OKEN Scanner

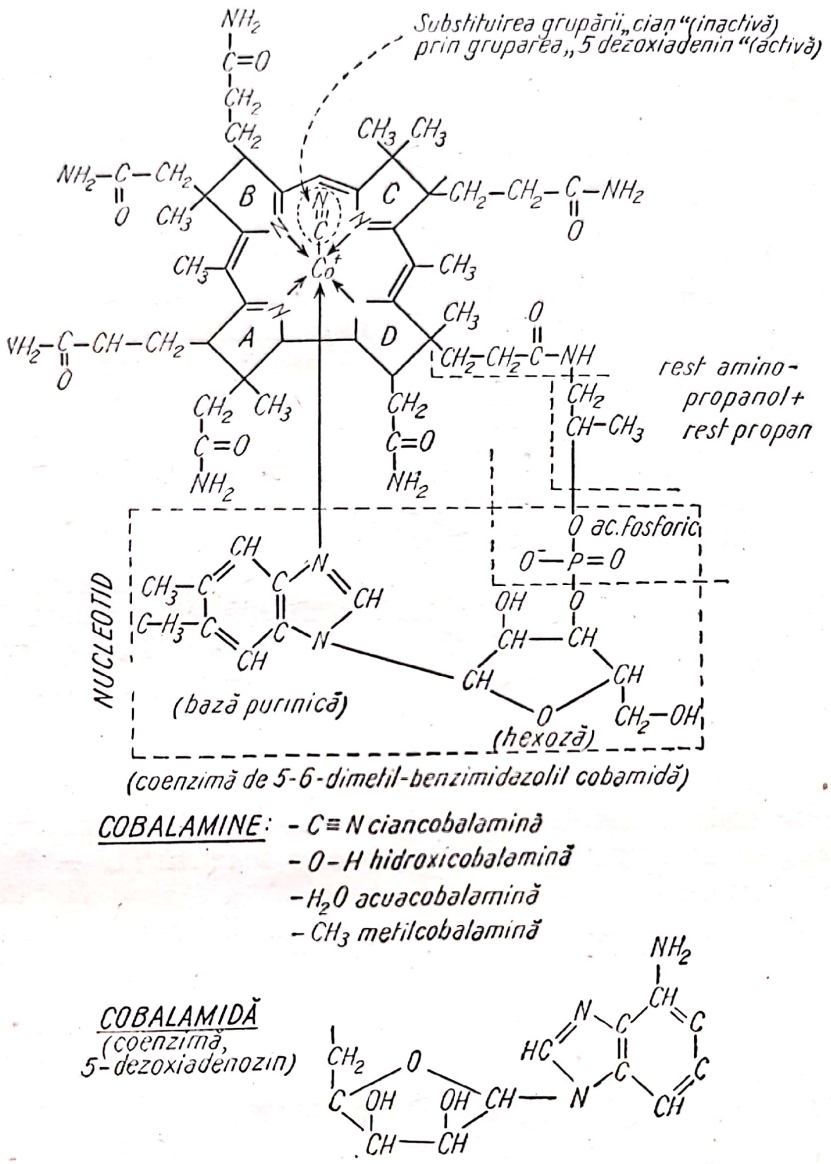


Fig. 4-11. Formula chimică a vitaminei B_{12} (ciancobalamina).

Molecula este alcătuită din 2 componente:

1) *porțiunea corinică* formată din: un *inel tetrapirolic* (porfirinic); pirolii sînt legați între ei de 3 ori prin cîte o punte meten (=C—) și o dată prin legătură directă; *radicali marginali* ai acidului tetrapirolic: amino-etanol ($—CH_2—CO—NH_2$), amino-propanol ($—CH_2—CH_2—CO—NH_2$) și metil ($—2\ H_3$); un *atom de cobalt* hexavalent în centrul nucleului tetrapirolic (care imprimă vitaminei culoarea roșie); el se leagă prin cîte o legătură de cei 4 atomi de azot ai pirolilor, prin a 5-a legătură de porțiunea nucleotidică, iar prin a 6-a de un *radical cian* (—C=N);

2) *porțiunea nucleotidică* dispusă perpendicular pe planul nucleului corinic; aceasta este formată din: *o bază azotată*, aici purinică (5,6-dimetil-benzen-imidazol), care se leagă de atomul de cobalt prin intermediul unui atom de azot imidazolic; *o riboză* (dezoxiriboză); *un rest acid fosforic*, care se leagă de unul din radicalii laterali ai ciclului tetrapirolic (rest propanol alungit cu un rest propan).

Această structură stabilă (cu gruparea „cian" legată de atomul de cobalt), deși este forma comercială a vitaminei, este inactivă. Ea este transformată în organism într-o formă activă prin înlocuirea cu alte grupări din care rezultă hidroxicobalamina, aquacobalamina, metilcobalamina și coenzima B_{12}-5′ dezoxiadenozina, forma activă din organism.

Transportul plasmatic al vitaminei B_{12}. Vitamina B_{12} radioactivă, administrată per os, împreună cu factorul intrinsec, se găsește în plasmă, în concentrație maximă, după circa 10 ore. Cea mai mare parte a vitaminei B_{12} plasmatică este legată de proteine. Au fost descrise pînă în prezent două proteine transportoare specifice, numite transcobalamina$_1$ (TC_1) — care este o α_1 globulină — și transcobalamina$_2$ $(TC)_2$, care este o β globulină. TC_1 este considerată a fi transportorul vitaminei B_{12} „exogene" (absorbite din intestin sau administrate intravenos) pe care o cedează rapid țesuturilor, în special ficatului. După 8 ore de la administrarea vitaminei B_{12} radioactive reapare în plasmă legată de TC_1 (considerată ca transportor al vitaminei B_{12} „endogene"), pe care o cedează apoi foarte lent țesuturilor. Cînd transportul plasmatic al vitaminei B_{12} depășește 1 μg/ml, la acești transportori proteici „primari" se asociază și alte proteine plasmatice din fracțiunea seromucoidă. TC_1 poate fi sintetizată și de granulocite, ceea ce explică nivelul plasmatic crescut al vitaminei B_{12} în leucemiile mieloice cronice și nivelul scăzut în leucopeniile cronice (139).

Dispariția din plasmă a vitaminei B_{12} diferă și de forma în care este administrată. O doză suprafiziologică (500—1 000 μg) de ciancobalamină, administrată intramuscular, duce la o excreție renală de 60—70% în decurs de 72 de ore. Nivelul plasmatic nu crește proporțional cu această doză, ceea ce dovedește că o bună parte din vitamină este fixată la nivelul locului de administrare. Dacă se administrează aceeași cantitate de hidroxicobalamină, nivelul ei seric crește rapid, persistînd 2—4 săptămîni, iar eliminarea urinară este mult mai scăzută (16—28% în decurs de 72 de ore) (139).

Conținutul de vitamină B_{12} al organismului. Organismul uman adult conține circa 2—5 mg de vitamină B_{12}, cu limite între 800 și 10 000 μg). Dintre toate organele ficatul conține cantitatea cea mai mare de vitamină (circa 2 mg), apoi rinichii; mușchii conțin circa 3 mg; celelalte organe conțin cantități mult mai mici. Timpul de înjumătățire a radioactivității vit. B_{12} hepatice este de circa un an. Manifestările clinice de anemie pernicioasă apar cînd nivelul vitaminei B_{12} în organism scade sub 20% din valorile fiziologice. Cu ajutorul contoarelor de scintilație cu care se înregistrează radioactivitatea corporală *(whole body counter)* se poate stabili stocul de vitamină B_{12} al organismului.

Excreția vitaminei B_{12} endogene este foarte redusă. Prin rinichi se elimină 0—300 μg/zi. Sucurile, gastric și pancreatic, conțin cantități mici de vitamină B_{12}. Cantități importante se elimină prin bilă (3—7 μg), ceea ce reprezintă de 2—3 ori cantitatea de vitamină endogenă eliminată prin fecale, bila fiind calea principală de excreție a vitaminei B_{12} din organism. Circa 2/3—3/4 din vitamina B_{12} biliară este reabsorbită prin intermediul factorului intrinsec, la nivelul ileonului distal (circuitul entero-hepatic al vitaminei B_{12}). Vitamina B_{12} din fecale provine și din descuamarea epiteliului intestinal, din sucurile gastrice, pancreatice și intestinale precum și din sinteza bacteriană din colon (80).

Rolul metabolic al vitaminei B_{12}. Recunoașterea legăturii dintre boala Biermer și carența unui „factor antianemic" (care s-a dovedit mai tîrziu

Scanned with OKEN Scanner

a fi vitamina B_{12}), a marcat un progres important în elucidarea acestei boli. În stadiul actual al cunoștințelor se știe că vitamina B_{12} acționează biochimic, în calitate de coenzimă, efectuînd transferuri inter-, sau intramoleculare de hidrogen (reacții de reducție și izomerizare), precum și transport de grupări metil. Există două forme coenzimatice principale ale vitaminei B_{12}: 5′-dezoxi-adenozil-B_{12} și metil-B_{12}.

Singurele reacții dependente de vitamina B_{12}, puse cu certitudine în evidență la om sînt:

— reacția de metilare a homocisteinei (în sinteza metioninei), donatorul de grupări metil fiind CH_3—FH_4; această reacție explică megaloblastoza din deficitul de vitamină B_{12} prin teoria „capcanei metabolice a folaților" sub formă de CH_3—FH_4, care nu mai poate fi regenerat în FH_4 (fig. 4-10);

— reacția de izomerizare a acidului D-metilmalonic (AMM) legat de coenzima A, în succinil CoA, pe calea metabolică a acidului propionic și care ar putea avea legătură cu apariția leziunilor nervoase în deficitul de vitamina B_{12}; eliminarea crescută a AMM în urină este unul din semnele deficitului acestei vitamine;

— reacția de reducere a ribonucleotidelor în dezoxiribonucleotide (care este dependentă de vitamină B_{12} la unele bacterii) nu a fost demonstrată pînă acuma cu certitudine la om; ea ar fi putut explica megaloblastoza din deficitul de vitamină B_{12} pe o cale independentă de folați.

În boala Biermer are loc o modificare a folatului eritrocitar (care scade), folatul seric fiind în concentrație normală sau chiar crescută, însă „blocat" sub formă de metil-FH_4. Din același motiv administrarea de acid folic în cantități fiziologice nu poate corecta megaloblastoza din boala Biermer (spre deosebire de aceea din carența de folați), iar cantitățile mai mari o corectează parțial și temporal. O situație analogă există și în cazul administrării vitaminei B_{12} în stările de carență folică (99, 230, 290, 327, 348).

c. **Metode de evidențiere a deficitului de vitamină B_{12}.** Determinarea concentrației de vitamină B_{12} în serul sanguin se face prin *metode bacteriologice*, utilizînd microorganisme dependente, în dezvoltarea lor, de această vitamină. Cele mai folosite sînt *Euglena gracilis, Escherichia coli* și *Ochromonas malhamensis*. Valorile normale se situează între 200 μg și 900 μg/ml ser (în medie 500 μg). Sînt considerate cert patologice valorile ce coboară sub 100 μg/ml ser.

Din 1950 au fost introduse mai multe metode de investigare cu vitamina B_{12} marcată cu cobalt radioactiv (^{60}Co B_{12}) (80).

Testul Schilling. Cel mai răspîndit test de apreciere a tulburării absorbției vitaminei B_{12} este, incontestabil, testul Schilling. Tehnica clasică prevede administrarea orală a unei cantități mici de vitamina B_{12} marcată (0,5 μg), iar la 2 ore injectarea intramuscular a 1 000 μg de vitamină B_{12} neradioactivă. Aceasta are rolul de a „spăla" de pe locurile de legare, vitamina B_{12} radioactivă administrată în prealabil *(flushing dose)*, împiedicînd-o să fie utilizată în măduva osoasă. În mod normal excreția

Scanned with OKEN Scanner

urinară a vitaminei B_{12} marcată este de 8—40%, pe cînd la persoanele cu anemie pernicioasă excreţia este nulă sau foarte redusă (1—4% din doza administrată).

3. VITAMINA B_6 (piridoxina)

a. **Structură chimică.** Vitamina B_6 este o denumire colectivă care cuprinde mai mulţi derivaţi ai piridinei. Alături de *piridoxină*, în natură se găsesc şi alţi produşi înrudiţi structural, ca *piridoxalul* şi *piridoxamina*. Cele trei forme ale vitaminei sînt uşor interconvertibile în organism (fig. 4-12).

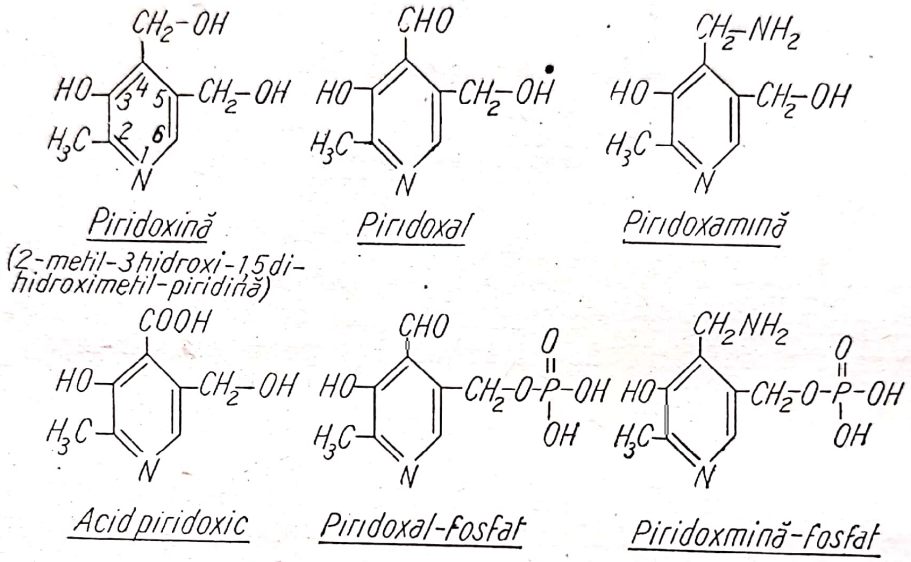


Fig. 4-12. Grupa vitaminelor B_6 (piridoxinei) (după G. A. Goldsmith, 1966).

Piridoxina reprezintă o triadă de derivaţi ai piridinei care, după felul grupării legate de C_4, primeşte denumirea de *piridoxol* (grupare alcoolică), *piridoxal* (grupare aldehidică) şi *piridoxamină* (grupare —CH—CH_2—NH_2). Prin fosforilarea piridoxalului sau a piridoxaminei la nivelul grupării hidroxilice din poziţia 5, se obţin esteri ce formează coenzime de decarboxilare şi transaminare a acizilor aminaţi (103, 194).

b. **Ciclul metabolic al vitaminei B_6.** Sursele cele mai importante de vitamină B_6 sînt: ficatul, carnea de vită, drojdia de bere, cerealele (grîul), zarzavaturile (varza) etc. Necesităţile de vitamină B_6 par a fi de circa 1 mg pe zi.

Rolul principal al vitaminei B_6 este în metabolismul acizilor aminaţi, dar şi al grăsimilor şi al hidrocarbonatelor. Sub forma de piridoxal-fosfat serveşte drept coenzimă în numeroase reacţii metabolice (sintetizarea unor proteine noi, proprii organismului, degradarea proteinelor în cadrul proceselor catabolice etc.).

În organism piridoxina se transformă în piridoxal-5-fosfat (PALPO), reacţie activată de piridoxalkinază după schema:

$$Piridoxal + ATP \longrightarrow Piridoxal-5-\textcircled{P} + ADP$$

În ultimii ani au fost obținute numeroase date în legătură cu rolul vitaminei B_6, în sinteza hemului. Din numeroasele etape ale anabolismului porfirinic, vitamina B_6 intervine în prima etapă de sinteză și anume în legarea glicin-piridoxal-5-fosfatului cu succinil-coenzima A. În lipsa vitaminei B_6 se constată prezența unei anemii hipocrome microcitare neinfluențate de administrarea de fier. Acest tip de anemie este însoțit de creșterea sideremiei și a fierului de depozit (anemie sideroacrestică); aportul terapeutic de fier duce la agravarea anemiei. În măduva osoasă se constată o hipercelularitate și o deviere la stînga a curbei de maturare eritroblastică (măduvă albastră) cu reacția Perls intens pozitivă. În circa 10% din cazuri, în deficitul de piridoxină, pot apare anemii cu caracter megaloblastic, explicate prin intervenția piridoxal-fosfatului în reacția de conversiune a serinei în glicină cu formare de hidroximetil-FH_4 care (sub formă de metilen-FH_4) intervine în sinteza timidilatului. În afară de anemiile prin deficit de piridoxină (foarte rare), există unele anemii refractare cu blocarea utilizării fierului (prin deficit enzimatic), care răspunde totuși la administrarea unor cantități mari de vitamină B_6.

c. **Metode de evidențiere a deficitului de vitamină B_6.** Metodele cele mai folosite de punere în evidență a carenței de vitamină B_6 sînt următoarele: *testarea microbiologică* (cu utilizarea de bacterii ca *Saccharomyces carlsbergensis); excreția urinară crescută* de acid xanturenic după administrarea unei doze de 10 g de d-1-triptofan; *excreția urinară scăzută* de acid piridoxic (în mod normal la 8 ore după administrarea de 25 mg piridoxină, se regăsește în urină peste 50% din cantitate).

4. VITAMINA C (acidul ascorbic)

Vitamina C a fost descoperită în 1928 în ardei, capsulele suprarenale etc., de către Szentgyörgyi căruia i s-a decernat, în 1937, premiul Nobel pentru chimie. Denumirea de acid ascorbic vine de la scorbut, boală ce poate fi vindecată cu această vitamină.

a. **Structura chimică** a acidului ascorbic a fost descoperită de Karren în 1932; din 1934 se prepară sintetic plecîndu-se de la glucoză; ea este asemănătoare cu a glucidelor monozaharidice (fig. 4-13). Vitamina C este o substanță acidă cu gust acru (de tăria acizilor carboxilici, deși nu are nici un carboxil liber). Aciditatea ei se datorește hidroxilului din poziția 3, grefat pe o dublă legătură (-OH enolic).

b. **Ciclul metabolic al vitaminei C.** Aport alimentar. Cele mai bogate surse de acid ascorbic sînt fructele citrice apoi piersicile, ananasul, căpșunile. Dintre zarzavaturi și legume, roșiile și varza conțin cantități ridicate. O cantitate importantă de vitamină C se pierde în cursul preparării alimentelor. Congelarea permite o păstrare relativ bună a acestei vitamine. În alimente acidul ascorbic se găsește, în cea mai mare parte, în stare liberă, doar o mică parte fiind legată de proteine. Absorbția vitaminei C se face cu ușurință prin tractul digestiv. Persoanele cu aclorhidrie sau care au primit o medicație alcalinizantă absorb o cantitate mai redusă de acid ascorbic.

Scanned with OKEN Scanner

Majoritatea speciilor animale (ca şobolanul) posedă capacitatea de a sintetiza acidul ascorbic în ţesuturi, nefiind necesar aportul alimentar. Alte vieţuitoare (omul, primatele, cobaiul, liliacul etc.) nu sînt capabile să transforme D-glucoza în L-acid ascorbic din cauza lipsei enzimei L-gulono-lacton-oxidaza. Bacteriile şi ciupercile nu sintetizează şi nici nu conţin acid ascorbic.

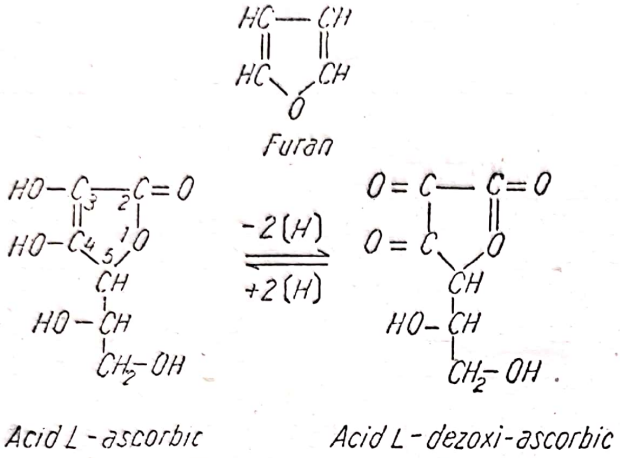


Fig. 4-13. Structura chimică a acidului ascorbic (după P. Karlson, 1967).

Acidul ascorbic este un derivat glucidic monozaharidic: lactona acidului 2-ceto-L-gluconic (cu 2 grupări dihidroxi-, la o dublă legătură). Molecula are 6 atomi de C cu un ciclu furanic care conferă substanţei instabilitatea. Acidul ascorbic are o acţiune puternic reductoare; prin pierderea de H se transformă în acid dehidro-ascorbic; reacţia este reversibilă; prin aceste proprietăţi vitamina C face parte din sistemul redox (163).

Ascorbinemia la om este de circa 7 mg‰; concentraţia acidului ascorbic în plasmă reflectă, în general, aportul dietetic recent. Acidul ascorbic nu este toxic; administrat timp îndelungat în doze de 1—2 g/zi nu produce nici un efect metabolic nociv. Necesităţile de acid ascorbic sînt de 10—100 de ori mai mari decît cele ale altor vitamine. Necesităţile alimentare minime sînt de 30 mg/zi pentru copiii mici, 70 mg/zi pentru adulţi şi 100 mg/zi în cursul sarcinii şi alăptării. Nevoile sînt, de asemenea, mai mari în infecţii, traumatisme, stări de stress.Acidul ascorbic se acumulează prea puţin în organism, fapt ce necesită un aport continuu. Depozitele tisulare maxime pot atinge 50 mg/kilocorp. Eliminarea vitaminei C se face practic prin urină (103).

Acţiune biologică. Acidul ascorbic are funcţii multiple; proprietatea sa cea mai importantă este capacitatea de oxido-reducere reversibilă. Vitamina C intervine ca donator de hidrogen în hidroxilările enzimatice; în legătură cu aceasta este de remarcat bogăţia în acid ascorbic a cortexului suprarenal, care se modifică în funcţie de starea funcţională a glandei. Rolul acidului ascorbic în *metabolismul fierului* se traduce, în primul rînd, prin potenţarea absorbţiei acestui metal la nivelul tractului digestiv. Mazur (1960) sugerează că acidul ascorbic acţionează în reducerea şi eliberarea fierului feric din legătura strînsă cu proteina plasmatică (transferina) şi încorporarea sa ulterioară în feritina tisulară. Vitamina C acţionează probabil în transformarea acidului folic în acid folinic de către FH_2-reductază, prin acţiunea de agent reductor (103, 163).

C. FUNCŢIA RESPIRATORIE A ERITROCITELOR

În funcţia sa de cărăuş, sîngele transportă ceea ce i se oferă; fiind un organ difuz şi în permanentă mişcare, el scaldă fiecare celulă hrănind-o sau încărcîndu-se cu produşii ei de excreţie, utili sau nocivi organismului.

Scanned with OKEN Scanner

Principalele funcţii legate de transportul sanguin sînt: funcţia respiratorie, nutritivă, de excreţie, de coordonare endocrino-umorală şi de apărare, reglarea temperaturii corpului, a presiunii sanguine şi a circulaţiei în general, reglarea echilibrului hidro-mineral, acido-bazic şi altele.

Funcţia respiratorie a sîngelui constă în transportul oxigenului din aerul atmosferic la ţesuturi şi a bioxidului de carbon de la ţesuturi la plămîni, de unde este eliminat în exteriorul organismului. Prin această funcţie eritrocitele au rol de intermediar între mediul extern şi mediul intern (125, 270).

Oxigenul vehiculat la ţesuturi ia parte, în continuare, la majoritatea proceselor biologice celulare, din care rezultă apa şi CO_2. În acest sens „respiraţia" constă din două etape distincte: externă şi internă.

Transportul oxigenului de către eritrocite este un fenomen biologic complex. Capacitatea de transport a O_2 este în funcţie de doi factori: încărcarea sîngelui cu Hb şi afinitatea Hb faţă de O_2. La alimentarea celulelor cu O_2, corespunzător cu necesităţile lor funcţionale, colaborează mai multe aparate şi sisteme cu largi rezerve funcţionale; acestea constau în: creşterea ventilaţiei („rezerva respiratorie"), creşterea fluxului sanguin („rezerva circulatorie"), creşterea concentraţiei de Hb („rezerva eritropoietică"), descreşterea afinităţii pentru O_2 („rezerva chimică") şi creşterea extracţiei de O_2 sanguin („rezerva capilară"). În condiţiile în care ventilaţia pulmonară, pompa cardiacă, sistemul vascular, capacitatea eritropoietică şi calitatea hemoglobinei sînt normale, „cererea şi oferta" de O_2 între cele două sectoare, separate de membrana eritrocitară, se realizează exclusiv pe baza curbei de disociere a Hb (303).

La volumul de circa 2 400 ml al masei eritrocitare şi la un număr de circa 5 000 000 de eritrocite pe mm^3, cu o suprafaţă de circa 140 μ^2 pentru un eritrocit, acestea totalizează o suprafaţă activă de 3 000—4 000 m^2, adică de aproximativ 2 000 de ori mai mult decît suprafaţa corpului. Dintre cele circa 25 000 de miliarde de eritrocite ale unui adult sănătos numai o parte se află în circulaţie, iar din acestea, o parte mai redusă circulă prin capilare, unde au loc schimburile gazoase.

Despre suprafaţa totală a membranelor alveolo-capilare nu există date exacte; numărul lor este evaluat între 150 de milioane şi 1 miliard, iar suprafaţa alveolară este evaluată între 300 şi 2 000 m^2. Eritrocitele care circulă la un moment dat prin plămîni acoperă circa 100 m^2 de suprafaţă respiratorie, ceea ce reprezintă aproximativ a 30-a parte din suprafaţa totală eritrocitară.

1. SCHIMBUL DE GAZE RESPIRATORII

Schimbul de gaze de la nivelul plămînilor sau a ţesuturilor se bazează pe legi ale fizicii (Boyle-Mariotte, Gay-Lussac, Dalton, Avogadro etc.). Reamintim din legile gazului enunţul legii lui Dalton: presiunea totală a unui amestec de gaze este egală cu suma presiunilor parţiale ale gazelor din amestec. Se ştie că aerul atmosferic este compus dintr-un amestec de gaze care, la nivelul mării, exercită pe suprafaţa terestră o presiune de 760 mmHg (tabelul 4-2); din aceasta numai 103 mmHg re-

Scanned with OKEN Scanner

vine O_2, cea mai mare parte aparţinînd azotului (aproape 600 mm Hg), gaz care nu participă la respiraţie.

Tabelul 4-2

Compoziţia gazelor atmosferice şi presiunile parţiale ale acestora la nivelul mării

Gazele din aerul atmosferic	Concentraţia (în %)	Presiunea parţială (în mm Hg)
Oxigen	20,96	158
Bioxid de carbon	0,04	0,3
Azot	79,00	596
Vapori de apă		5
Total	100,00	760,3

La nivelul alveolelor pulmonare cele două gaze respiratorii (O_2 şi CO_2) intră în competiţie, avînd permanent tendinţa de a se exclude reciproc; presiunea lor parţială este de 103 mmHg pentru O_2, respectiv 40 mm pentru CO_2, raport care se modifică în alte regiuni ale organismului; de exemplu în sîngele venos presiunea parţială a O_2 este în medie de 30 mmHg, iar a CO_2 de 46 mmHg.

Schimburile de O_2 şi CO_2 între alveole şi sînge se petrec rapid; durata trecerii sîngelui prin acest loc este de numai 0,7 secunde; în caz de efort fizic, chiar 0,4 sec., timp totuşi suficient să se producă oxigenarea sîngelui.

Dacă pentru circuitul oxigenului în schimburile de gaze există o singură cale simplificată de pasaj, pentru CO_2 există mai multe căi metabolice, CO_2 găsindu-se sub diferite forme (gaz dizolvat, acid carbonic, bicarbonat de Na, bicarbonat de K, carbhemoglobină etc.). Pe de altă parte, CO_2 face parte din ambele componente ale celui mai important cuplu de sistem tampon din organism, cuplul acido-bazic. Azotul se găseşte în aceeaşi cantitate, corespunzător solubilităţii sale, în plasmă şi eritrocite (1 cm^3 N_2%), indiferent de sectorul circulator cercetat (plasmă, sînge venos sau arterial), pe cînd O_2, pe lîngă forma dizolvată, care este infimă (0,30 cm^3 %), este transportat aproape în totalitate sub formă de Hb eritrocitară; CO_2 are o comportare particulară prin rolul pe care-l joacă în menţinerea echilibrului acido-bazic.

Anhidraza carbonică (carbo-anhidraza) este o enzimă care se găseşte în concentraţii mari în eritrocite. Este enzima care facilitează reacţia de interconversiune a gazului carbonic şi a acidului carbonic (H_2CO_3), reprezentată schematic în formula: $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO^{\ominus}_3 + H^+$.

Această enzimă asigură deci menţinerea şi restabilirea rapidă a echilibrului acido-bazic celular şi umoral. În afară de schimbările de ioni HCO_3^- şi H^+ se realizează, în mod indirect şi echilibrul altor ioni ca Na^+ şi Cl^-.

a. **Transportul oxigenului.** Modalitățile de transport ale oxigenului sînt foarte diferite pe scara filogenetică. Cea mai simplă vehiculare de oxigen este preluarea lui direct din apa de mare, de exemplu la ființele cele mai rudimentare cu o capacitate de transport a O_2 de 0,5 cm^3 % substanță transportoare. La ființe ceva mai evoluate (viermi) transportul oxigenului se face de o plasmă incoloră, conținută în cavitatea generală, cu o capacitate de transport de circa 6 cm^3 O_2 %. La ființe cu o organizare mai complexă plasma conține o cromoproteidă porfirinică dizolvată, de o culoare roșie, cu o greutate moleculară de circa 2 750 000, numită *eritrocruorină*. La ființe și mai evoluate transportul oxigenului se face de eritrocite; ele de asemenea prezintă o gamă întreagă de diferențe în funcție, între altele, de gradul de dezvoltare filogenetică. La animalele mai evoluate transportul oxigenului se face de eritrocite nucleate mari, puține ca număr și sărace în pigment respirator. La animalele cele mai evoluate eritrocitele, ajunse la un grad mai înalt de perfecționare, își elimină nucleul, celula menținîndu-și exclusiv funcția transportoare de oxigen cu o capacitate de 20—22 cm^3 O_2%.

Transportul oxigenului în organismul uman este realizat, practic de hemoglobina eritrocitară, fracțiunea de O_2 dizolvată fizic în plasmă reprezentînd doar 0,3 cm^3 %. Dacă transportul O_2 la om s-ar efectua exclusiv de către plasmă, ca la ființele inferioare, pentru a acoperi doar nevoile de repaus ar fi necesară o cantitate de 300 l de plasmă pe minut (în loc de 3—4 l). Cu ajutorul hemoglobinei sîngele transportă deci de peste 100 de ori mai mult O_2 decît poate dizolva fizic plasma. Cu toate acestea oxigenul dizolvat în plasmă, deși este în cantitate atît de redusă, reprezintă forma intermediară obligatorie de transfer a oxigenului.

Marele rezervor sanguin de oxigen rămîne hemoglobina eritrocitară. Cele aproximativ 800 g de hemoglobină ale unui individ sănătos conțin circa 1 000 cm^3 O_2, dacă este saturată în întregime (1 g Hb poate capta 1,34 cm^3 O_2). Un individ în stare de repaus consumînd circa 300 ml de oxigen pe minut, rezervele sale de oxigen din sînge nu ajung mai mult decît pentru 3 minute, chiar dacă acest oxigen ar putea fi consumat pînă la epuizarea lui totală, atît din sîngele venos, cît și din cel arterial. Omul (și în general mamiferele) nu posedă în realitate rezerve de oxigen, oxihemoglobina constituie o rezervă doar în condițiile asigurării unei respirații normale sau foarte apropiate de cea normală.

b. **Transportul bioxidului de carbon.** CO_2 se găsește, atît în plasmă, cît și intraeritrocitar; din cei 55—60 ml de CO_2 cît se găsesc în 100 ml plasmă, doar o proporție mică (circa 3 vol., respectiv 5%) apare sub această formă, cea mai mare parte aflîndu-se sub formă de diverse combinații chimice, dintre care domină bicarbonații (de Na și K), dar mai ales bicarbonatul de Na din plasmă (circa 50 vol., adică 80—85%).

CO_2 se găsește în eritrocite în cantitate mult mai mică decît în plasmă (circa 5%); transportul lui între eritrocit și plasmă este dominat de starea chimică a Hb. Cu ajutorul anhidrazei carbonice și pe baza fenomenului de membrană Hamburger, se realizează o translocare de CO_2 foarte complicată care, în realitate, are un singur sens funcțional.

Scanned with OKEN Scanner

În eritrocite CO_2 se găsește doar instantaneu sub această formă sau ca CO_3H_2; predominant el este legat de K sub formă de bicarbonat, dar mai ales legat de hemoglobină, sub formă de carbhemoglobină. Natura fixării CO_2 la molecula de hemoglobină nu este pe deplin elucidată. Nu se știe încă cu certitudine dacă CO_2 se leagă de globină într-un anumit loc sau dacă globina joacă un rol indirect de donor și acceptor de hidrogen la nivelul moleculelor de histidină.

Cantitatea de carbhemoglobină (Hb redusă) este mult mai mare în sîngele venos (circa 25%) față de aceea din sîngele arterial, hemoglobina redusă avînd proprietatea de a se combina cu o cantitate mai mare de CO_2 decît oxihemoglobina. Carbamatul de hemoglobină (sau mai scurt carbhemoglobina) este o combinație foarte labilă, a cărei descompunere e favorizată de creșterea presiunii de oxigen din plămîn, ea fiind dislocată de oxihemoglobină. Combinarea Hb cu CO_2 nu trebuie înțeleasă în sensul combinărilor existente între O_2 sau CO, care se leagă reversibil de fierul bivalent. Formele în care are loc transportul CO_2 în sînge și eliminarea lui, se repartizează în felul următor: 10% CO_2 dizolvat, 20—25% CO_2 sub formă de carbhemoglobină, iar 65—70% sub formă de CO_2 eliberat din CO_3H^- sub acțiunea anhidrazei carbonice.

2. CURBELE DE DISOCIERE ALE OXIHEMOGLOBINEI

Sîngele venos agitat la aer își schimbă culoarea; din roșu închis el devine roșu aprins din cauză că hemoglobina, fixînd oxigenul, se transformă în oxihemoglobină (fig. 4-14).

Într-o atmosferă săracă în O_2 (munți înalți, zboruri la mari altitudini), are loc acumularea unei cantități mai mari de sînge în plămîni în scopul creșterii fixării și transportului de O_2. La aceste scăderi de presiune organismul sănătos se adaptează într-un interval de cîteva zile, de exemplu, în cazul competițiilor de pe platourile înalte (Mexico, Chile etc.) unde sportivii desfășoară performanțe pînă la stabilirea chiar a unor recorduri mondiale. Peste înălțimea de 4 000 m apare însă un deficit de saturație în oxigen, care rămîne necompensat chiar la indigeni; la altitudini de peste 5 000 m nu pot rezista nici organismele cele mai bine adaptate (tabelul 4-3). Din contra, presiunile mari de O_2 sînt bine suportate, Hb tinzînd, în aceste situații, către o saturare maximă în sîngele arterial.

Tabelul 4-3

Variațiile cantitative ale O_2 în funcție de altitudine

Altitudinea (în m)	Presiunea atmosferică (în mm Hg)	Presiunea parțială a O_2	Concentrația O_2 sanguin (vol. %)	Punctul de fierbere al apei
0	760	160	20	100°C
2 000	600	125	16	93°C
5 000	400	85	11	83°C
10 000	200	40	6	67°C
20 000	50	10	1	35°C

Scanned with OKEN Scanner

În afară de presiunea parţială a O_2 există şi alţi factori care favorizează legarea sau disocierea oxigenului de Hb (concentraţia CO_2, temperatura exterioară, concentraţia salină etc. La concentraţiile mari de CO_2 (corespunzînd nivelului ţesuturilor cu concentraţii mici de O_2) curba are

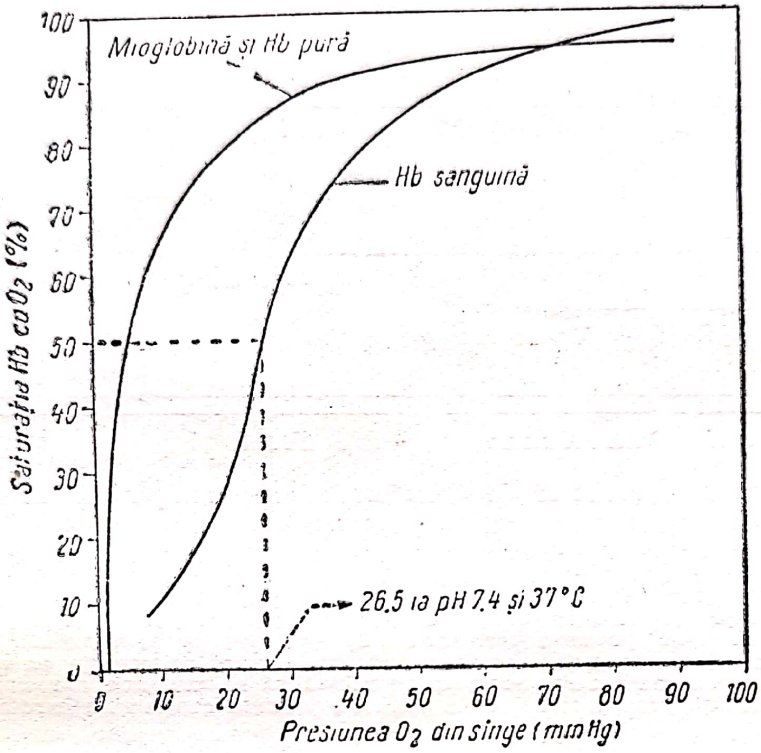


Fig. 4-14. Curbele de fixare şi de disociere a oxigenului pe hemoglobina eritrocitară, pe mioglobină şi pe hemoglobina pură (soluţie de Hb dizolvată în apă după liza eritrocitelor).

Legarea şi desprinderea oxigenului la aceste trei substanţe heminice nu se face după o linie oblică dreaptă ci cu anumite inflexiuni:

Hemoglobina eritrocitară descrie o curbă cu o dublă inflexiune, asemănătoare literei sigma, a cărei porţiune incipientă apare ca o pantă uşor înclinată după care urmează o curbă aproape verticală cu o zonă de legare maximă între 20 şi 60 mmHg, iar segmentul terminal descrie iarăşi o pantă lină. La variaţii medii de concentraţie a O_2 se produc totuşi disocieri mari; în acest fel oxigenul se poate desprinde de Hb şi lega de ţesuturile sărace în acest gaz.

Disocierea *mioglobinei* şi a *hemoglobinei dizolvate* este diferită de a oxihemoglobinei. Afinitatea mioglobinei pentru oxigen este de aproximativ 5 ori mai mare decît a hemoglobinei eritrocitare; sîngele cedează mioglobinei oxigenul, chiar dacă se află la presiuni foarte scăzute, de exemplu, la presiunea de 20 mmHg circa 2/3 din O_2 a şi fost fixat de mioglobină. Curba de disociere descrie astfel o linie ce se ridică abrupt, aproape paralel cu ordonata, presiunile mari nefiind necesare pentru această legare.

Indiferent de felul substanţei heminice (OxiHb, mioglobină sau Hb pură), fenomenul se petrece invers cînd ţesuturile eliberează O_2, cedîndu-l acestora.

tendinţă la „turtire", pe cînd la concentraţii scăzute de CO_2 (care coincid, la nivelul circulaţiei pulmonare, cu concentraţii mari de O_2) curba se „ridică" brusc apropiindu-se de curba de disociere a mioglobinei şi a Hb pure, cu păstrarea însă a formei sigmoide.

Curba de disociere a hemoglobinei nu trebuie văzută doar parțial, ca în reprezentarea din fig. 4-14, ci ca pe o sinusoidă rezultată din jocul influențelor diferiților factori asupra hemoglobinei, supuse unor presiuni variabile de O_2 și CO_2 (fig. 4-15).

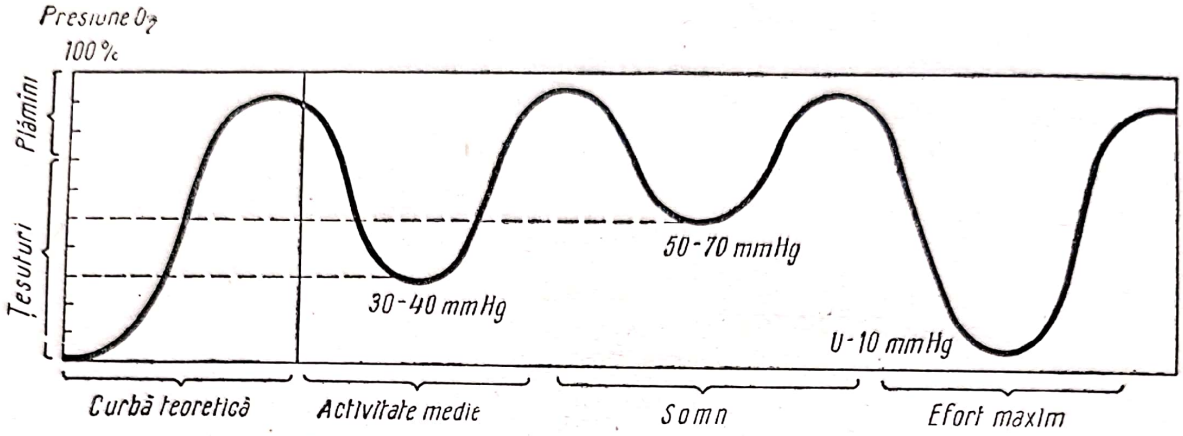


Fig. 4-15. Succesiunea curbelor de disociere a oxigenului în diferite situații fiziologice și patologice.

Cedarea și captarea oxigenului alveolar și tisular se desfășoară ca o „undă" ale cărei inflexiuni nu sînt rigide. Aceste presiuni sînt, în aerul alveolar, în jur de 100 mmHg pentru O_2 și de circa 46 mmHg pentru CO_2. În sîngele venos, unda presiunilor scade la circa 30—40 mmHg pentru O_2 (sau chiar la zero în cursul eforturilor mari), coborînd relativ puțin în cursul somnului (60—70 mmHg), pe cînd presiunea CO_2 este mai puțin variabilă din cauza sistemelor tampon. În stările de asfixie, cînd sîngele nu se mai primenește cu oxigen, presiunea O_2 la nivelul alveolelor fiind zero, acest gaz continuă să se consume din sînge pînă la epuizarea lui aproape totală, atîta timp cît persistă contracțiile cardiace.

3. SUCCESIUNEA BIOCHIMICĂ A SCHIMBURILOR GAZOASE

a. **Schimbul de gaze în țesuturi.** Țesuturile în activitate produc zilnic — pe lîngă alți produși de catabolism — circa 1 kg de acid carbonic, care trebuie evacuat, după tamponarea lui prealabilă. Plasma nu ar putea realiza acest lucru dacă nu ar interveni eritrocitele în transportul și eliminarea lui.

În interiorul eritrocitelor din circulația arterială se află oxihemoglobina, (acid mult mai puternic decît hemoglobina redusă — cu punctul izoelectric la pH 6,78 față de 7,8); ea este legată de ionul de K^+ (element care se găsește într-o cantitate mare în eritrocite), sub formă de $KHbO_2$. La nivelul capilarelor tisulare, unde tensiunea O_2 este scăzută, iar tensiunea de CO_2 crescută, acest gaz pătrunde întîi în plasmă; aici (negăsind alcalii liberi), difuzează în eritrocite, unde este aproape instantaneu transformată în acid carbonic de către anhidraza carbonică (prin combinare cu o moleculă de apă ($CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$). Creșterea concentrației de H_2CO_3 din eritrocit acidifiază mediul, determinînd disocierea oxihemoglobinei (al cărui O_2 pătrunde în țesuturi), care se transformă în Hb redusă (KHb), aceasta fiind un acid mult mai slab decît oxihemoglobina. Ea cedează ionul K^+, care este preluat de ionul bicarbonat (CO_3H^-) cu formare de bicarbonat de K, Hb fixînd în schimb ionul H^+ obținut prin disociația electrolitică a acidului carbonic. Prin aceasta conținutul de ioni de bicarbonat devine mai mare în eritrocite decît în plasmă.

Întrucît cationii de Na^+ și K^+ difuzează greu prin membrana semipermeabilă eritrocitară, pentru restabilirea echilibrului ionic, are loc pătrunderea în eritrocit a anionului Cl^-, care se găsește în plasmă sub formă de NaCl, lăsînd liber catio-

nul Na^+. Ionii $^-HCO_3$ părăsesc acum eritrocitele (în schimbul clorului) și se combină cu Na formînd $NaHCO_3$. Acest fenomen, denumit „migrarea ionilor clor" sau *fenomenul Hamburger*, reprezintă o etapă foarte importantă, atît în menținerea echilibrului acido-bazic, cît și în transportul de gaze. Hemoglobina fiind închisă în eritrocite, nu participă direct la fenomenul de deplasare a anionilor, ci prin intermediul ionilor de clor, care au capacitatea de a pătrunde și părăsi eritrocitele (echilibrul de membrană Donan).

Trebuie menționat că ionul CO_3H^- din eritrocite duce la creșterea presiunii osmotice cu atragerea unei cantități de apă, ceea ce are ca rezultat umflarea eritrocitului. Aceasta explică faptul că eritrocitul este mai voluminos în sîngele venos decît în cel arterial.

Datorită fenomenului de migrare a ionilor de clor, eritrocitele reprezintă un sistem tampon foarte important, alături de cele din plasmă. Prin pătrunderea ionului Cl^- în eritrocite, în schimbul ionului CO_3H^-, sîngele integral are o capacitate de transport a CO_2 mai mare decît plasma izolată.

b. **Schimbul de gaze în alveole.** La eliminarea CO_2 din plămîni, procesul descris anterior se desfășoară în sens invers. Oxigenarea hemoglobinei reduse (Hb), urmare presiunii crescute a O_2 în alveole, grăbește expulzarea CO_2, întîi din eritrocite, apoi din plasmă. Deoarece oxigenarea hemoglobinei în plămîni o transformă într-un acid mult mai puternic, se favorizează disocierea KCO_3H, cationul fiind preluat de Hb (sub formă de $KHbO_2$). Ionii HCO_3^- din eritrocite se combină cu H^+ eliberat de HHb dînd H_2CO_3 nedisociat, care este desfăcut — de data aceasta în sens invers — de către anhidraza carbonică, în CO_2 și H_2O. Bioxidul de carbon trece întîi în plasmă, iar apoi difuzează în aerul alveolar. Accelerarea eliminării sale din plasmă este favorizată de ionii de Cl^-, care părăsesc KCl eritrocitară și trec în plasmă, combinîndu-se cu Na furnizat de $NaHCO_2$, sub forma de NaCl. Acidul carbonic din plasmă reintră în eritrocit, unde este desfăcut de anhidraza carbonică, după care este eliminat prin plămîni. CO_2 dizolvat în plasmă — deși redus cantitativ — reprezintă deci, ca și pentru O_2 dizolvat plasmatic, un stadiu obligatoriu, atît la nivelul țesuturilor, cît și al plămînilor. La nivelul țesuturilor el declanșează întregul lanț de procese metabolice, iar la nivelul alveolar este primul care se elimină, atrăgînd după el (tot sub formă de CO_2 dizolvat) celelalte combinații ale CO_2.

4. TULBURĂRI ALE FUNCȚIEI RESPIRATORII A ERITROCITELOR

a. **Oxi- și dezoxihemoglobina.** La nivelul plămînilor, unde presiunea parțială a oxigenului este mare (100 mmHg), aproape întreaga cantitate de hemoglobină se transformă în oxihemoglobină. La nivelul țesuturilor unde presiunea parțială a acestui gaz scade, din cauza consumului lui în țesuturi, oxihemoglobina se disociază, cedînd o parte din oxigenul pe care îl conține, devenind dezoxihemoglobină sau Hb redusă. Presiunea parțială a oxigenului în țesuturi este de circa 30 mmHg, dar ea poate să oscileze între 0 și 60 mmHg, în funcție de starea de activitate a țesuturilor.

Capacitatea de fixare a oxigenului de hemoglobină este de 1,34 cm^3 pentru 1 g de hemoglobină; de exemplu, 100 ml sînge conținînd 15 g Hb, se încarcă, teoretic, cu 20,1 ml O_2 ($1,34 \times 15$). De fapt sîngele unui bărbat

Scanned with OKEN Scanner

sănătos, care conţine 15—16 g de Hb%, fixează numai 19—20 cm^3 de oxigen, iar sîngele unei femei sănătoase, cu 14—15 g de Hb%, fixează numai 18—19 cm^3 de oxigen, oxihemoglobina reprezentînd 95—98% din Hb sîngelui arterial; restul de circa 3% rămînînd sub formă redusă. Chiar dacă sîngele venos, în trecerea lui prin alveolele pulmonare s-ar oxigena aproape în totalitate, el se „contaminează" cu sînge venos prin anastomozele arterio-venoase.

Sîngele venos de repaus conţine 65—75% oxihemoglobină, diferenţa de 25—35% corespunde oxigenului difuzat la ţesuturi. Procentul de hemoglobină neoxigenată (redusă) este însă, în mare măsură, în funcţie de specificul ţesuturilor respective şi de starea lor de activitate. În caz de efort, proporţia acesteia scade la jumătate din total sau chiar la mai mult. În cursul unui travaliu intens sîngele venos, provenit de la musculatura hiperactivă, este lipsit practic de oxigen (acest fenomen este însă local şi tranzitoriu), proporţia de Hb redusă modificîndu-se ulterior la nivelul circulaţiei generale prin amestecul sîngelui.

Cianoza apare clinic cînd sîngele circulant conţine peste 1/3 din hemoglobină în stare dezoxigenată adică atunci cînd peste 5 g de hemoglobină (din cele 15 g% ale adultului) sînt lipsite de oxigen. Din cele 19 volume de oxigen arterial normal (faţă de maximum 20 vol. teoretice) şi cele din circa 14 volume de oxigen rămas încă necedat din sîngele venos, rezultă aproximativ 7 vol. din oxigenul total sanguin care a fost consumat anterior de ţesuturi: 20—19=1 (pentru sîngele arterial) şi 20—14=6 (pentru sîngele venos); 1+6=7 (dezoxiHb); 7 : 2=3,5 vol. (la nivel capilar). Cum sîngele capilar (unde se remarcă eventuala stare de cianoză), are o compoziţie intermediară de sînge (arterial şi venos), reiese că, în mod normal, consumul de O_2 la nivelul capilarelor este de 3,5 vol. Pentru apariţia cianozei hemoglobina redusă din capilare trebuie să depăşească 6 volume, ceea ce corespunde unei diferenţe arteriovenoase de cel puţin 12 volume de O_2 (ex. 2+12=14 : 2=7) (fig. 4-16). Deşi raportul dintre sîngele arterial şi cel venos nu este de 1 : 1 ci de circa 1 : 6 raportarea poate fi făcută totuşi de la egal la egal întrucît la nivelul capilarului proporţia de sînge arterial şi cel venos este aproximativ egală.

Apariţia cianozei nu depinde atît de creşterea procentuală a hemoglobinei reduse, cît mai ales de creşterea valorii absolute a acesteia. Cifrele arătate mai sus sînt valabile pentru nivele de hemoglobină apropiate de cele normale; bolnavii intens anemici nu devin cianotici, chiar dacă hemoglobina redusă creşte peste valorile procentuale amintite. În cazul unei anemii de 10 g Hb%, cianoza poate apare doar cînd peste jumătate din hemoglobină se găseşte sub formă redusă, iar în cazurile în care anemia este foarte gravă (de exemplu 5 g Hb%) cianoza nu apare. Bolnavii cu poliglobulie prezintă cianoză a tegumentelor şi mucoaselor chiar dacă hemoglobina redusă se menţine în limitele normale (eritrocianoză), deoarece, deşi procentul de Hb redusă este în limite normale, cantitatea absolută este mai mare datorită pletorei sanguine caracteristice bolii. Cînd 1/4 din hemoglobină este sub formă redusă, apare o cianoză marcată avînd în vedere că la cele circa 8—10 milioane de eritrocite pe

Scanned with OKEN Scanner

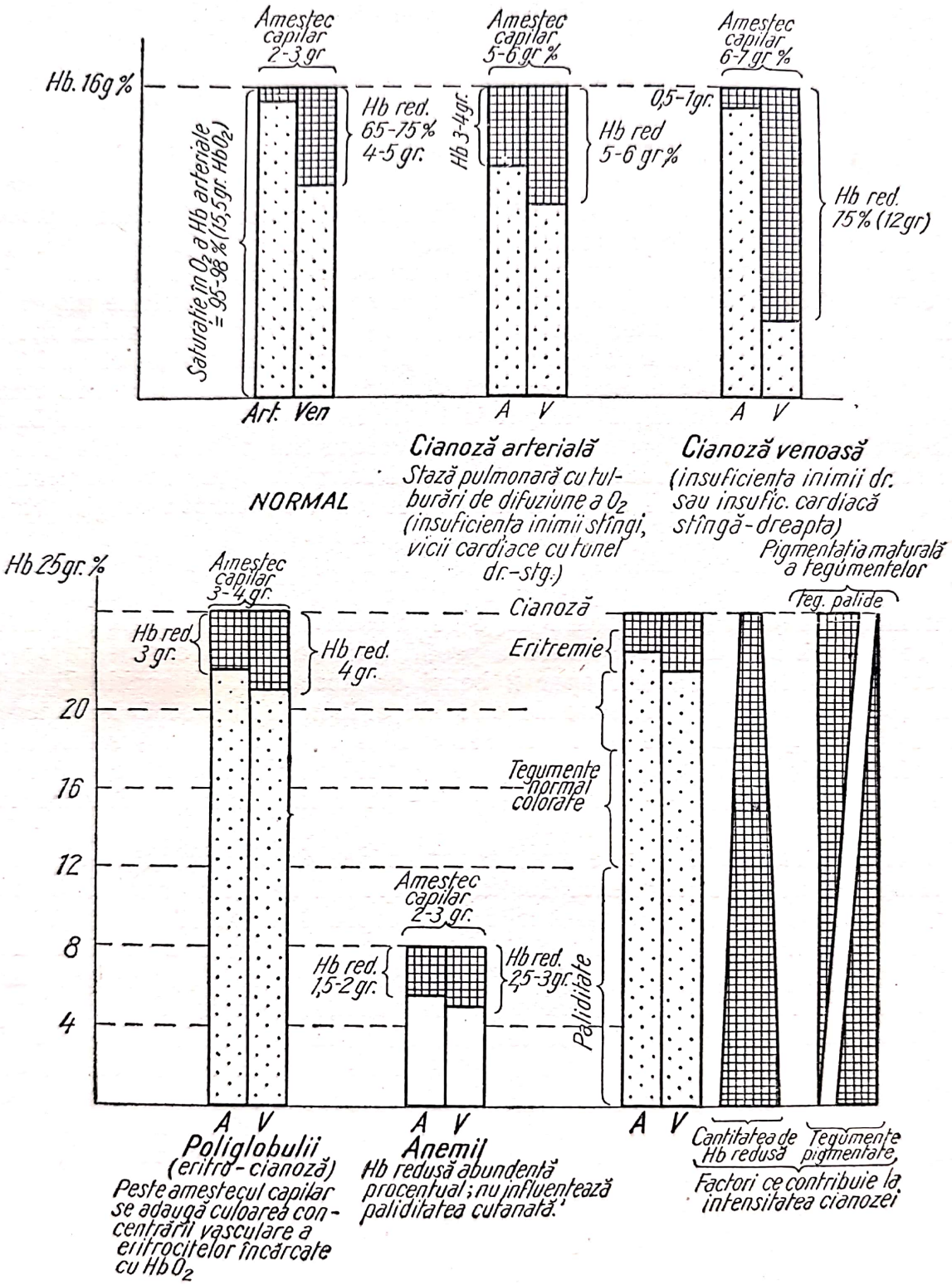


Fig. 4-16. Reprezentarea figurativă a modalităților de apariție a cianozei, a tipurilor de cianoză și a factorilor care influențează accentuarea sau atenuarea cianozei. Un g de Hb transportă (teoretic) 1,34 cm³ de O_2. Sîngele arterial se încarcă cu O_2 într-o proporție de 95—98%, iar cel venos mai conține O_2 în proporție de 65—75%. Cianoza se instalează, în general, cînd sîngele (total) transportă peste 30% Hb dezoxigenată.

Scanned with OKEN Scanner

mm³ și 1 500—1 800 g hemoglobină totală (20—25 g%), hemoglobina redusă este de cel puțin 300—350 g, cifră aproape dublă față de normal.

OxiHb se caracterizează prin două benzi de absorbție în lumina vizibilă, la 541 și 577 mμ, iar Hb redusă are o singură bandă asimetrică situată la 555 mμ.

b. **Carboxihemoglobina (COHb) și intoxicația cu oxid de carbon.** Deși legătura oxidului de carbon cu Hb este disociabilă, afinitatea acestui gaz față de Hb este de circa 250 de ori mai mare decît a oxigenului. Oxidul de carbon se produce în cantitate mare în cazurile de ardere incompletă a materiilor organice (de exemplu, în încăperile cu sobele cu tiraj insuficient, în garajele închise în care se pune în funcțiune motorul, în cazurile în care gazele de combustie se infiltrează în cabina mașinii etc.). Prezența lui în aerul atmosferic într-o proporție de circa 0,1% (deci de 200 de ori mai puțin decît a oxigenului), duce la blocarea competitivă a hemoglobinei, în proporție de circa 50%. Toxicitatea oxidului de carbon constă în faptul că COHb nu poate îndeplini rolul de transportor al oxigenului, blocarea Hb în această formă ducînd la o „anoxemie" prin tulburare de transport. Intoxicația cu oxid de carbon este mortală dacă 2/3 din hemoglobină a fost transformată în COHb.

Carboxihemoglobina are o culoare roșie-vișinie. Identificarea ei se face spectroscopic. Pentru precizarea cauzei morții în cazuri suspecte de intoxicație cu CO, se recoltează sînge de la cadavru dintr-o venă profundă și se adaugă apă distilată pentru a produce hemoliza; la examenul spectroscopic al hemolizatului apar 2 benzi de absorbție, în zonele D și E (la 568 și 539 mμ), apropiate de cele ale oxihemoglobinei. Diferențierea față de aceasta se face prin tratarea probei cu o substanță reductoare (dihidrosulfit de Na), după care benzile oxihemoglobinei se reduc la o singură bandă grasă — banda Stokes — pe cînd spectrul carboxihemoglobinei persistă nemodificat.

c. **Methemoglobina** este un derivat oxidat de hemoglobină al cărui fier se află în stare trivalentă (ferică), incapabilă de a fixa reversibil oxigenul și de a-l ceda apoi țesuturilor; ea imprimă sîngelui o nuanță maronie. În afară de prezența Fe^{+++}, MetHb se deosebește de OxiHb prin înlocuirea O_2 cu gruparea — OH. Denumirea de methemoglobinemie este în realitate improprie; ar fi mai adecvat termenul de methemoglobinocitemie, întrucît MetHb se găsește intraeritrocitar și nu liberă în plasmă. Există un grad fiziologic de MetHb-emie care însă nu depășește 1% din Hb totală. MetHb este lipsită de toxicitate proprie; transformarea pigmentului respirator în acest derivat duce la pierderea capacității sîngelui de a transporta oxigenul, cu toate semnele anoxemiei consecutive. Cianoza apărută în afara unor anomalii cardiace sau pulmonare sugerează existența unei methemoglobinemii. O concentrație de MetHb de 1,5—2 g% provoacă o cianoză vizibilă, iar la o concentrație de 5 g% cianoza este proporțional mai pronunțată, în timp ce o concentrație de peste 10 g% imprimă sîngelui o nuanță negricioasă. Cele mai ridicate concentrații de MetHb apar în anumite hemoglobinopatii, și chiar enzimopatii (cu deficit de diaforază), unde valorile oscilează între 10 și 40%, uneori și mai mult, pe care însă bolnavii le suportă relativ bine. Concentrațiile letale

Scanned with OKEN Scanner

trebuie să depășească valoarea de 70% (303). MetHb poate fi identificată la spectroscop sub forma unor benzi de absorbție (vîrfuri) în roșu, situate la 500 și 635 mμ (vezi și fig. 5-33).

În patologie, methemoglobinemiile pot fi ereditare (prin methemoglobinopatii și enzimopatii) și dobîndite în urma unor intoxicații, mai ales acute, cu nitriți (frecvente la copii), sulfonamide, derivați de anilină etc. (vezi și pag. 261 și 263).

d. **Alte combinații chimice ale hemoglobinei.**

Cianhemoglobina. În intoxicația cu acid cianhidric, chiar în cazurile mortale, nu se decelează spectroscopic cianhemoglobina, ceea ce dovedește că acidul cianhidric nu intoxică hemoglobina; toxicitatea ei se datorește suprimării respirației celulare prin blocarea fermenților respiratori (citocromoxidare). Din această cauză oxigenul transportat de Hb nu poate fi utilizat de țesuturi, încît sîngele, chiar cel venos, are o culoare roșie deschisă (142).

Verdoglobina sau *coleglobina* este prima componentă fiziologică a catabolismului hemoglobinei, caracterizată prin desfacerea lanțului tetrapirolic cu menținerea încă a legăturii cu globina și fierul (vezi și fig. 7-29). Această reacție este ireversibilă, fiind expresia unei alterări profunde a hemoglobinei, care poate fi provocată de factori variați. Diferitele verdoglobine (A, S, CW, PH etc.) prezintă la spectroscop benzi de absorbție cuprinse între 615 și 649 mμ, care nu dispar prin adăugare de substanțe alcaline.

Ca și unele methemoglobinemii toxice și sulhemoglobinemii, verdoglobinemiile pot fi provocate de substanțe toxice industriale, alimentare sau medicamentoase. În multe cazuri nu au putut fi stabilite cauzele, încriminîndu-se stări toxiinfecțioase, tulburări metabolice etc. Verdoglobina fiind o formă ireversibilă de alterare hemoglobinică, tratamentul (cînd este cazul) constă în exsanguinotransfuzie.

II. PROCESE METABOLICE CORELATE CU FUNCȚIILE ERITROCITARE

A. PRINCIPALELE PROCESE METABOLICE ALE ERITROCITULUI

În urmă cu cîteva decenii eritrocitele erau considerate vezicule inerte umplute cu hemoglobină, pe care pompa cardiacă le vehiculează de la plămîni la țesuturi și invers, pentru transportul oxigenului. Astăzi se știe că eritrocitele adulte, deși lipsite de nucleu și de organite celulare, sînt celule ajunse la un grad avansat de specializare. În cursul maturării lor s-a realizat o simplificare importantă a aparatului lor celular; enzimele eritrocitare sînt moștenite din etapa cînd eritrocitele au fost celule complete. Cu ajutorul lor eritrocitele, care și-au pierdut capacitatea de sin-

Scanned with OKEN Scanner

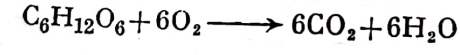
teză proteică, își menţin capacitatea sintezei mono- și dinucleotidelor (ATP, NADP, NAD etc.) fără de care nici activitatea energetică, nici cea respiratorie nu ar putea fi menţinute (tabelul 4-4) (41, 44, 143, 166).

Tabelul 4-4

Prezentare schematică a activităţilor metabolice în celulele seriei roșii în diferite stadii evolutive. (Modificat după J. W. Harris, 1963)

	Proeritroblaşti şi eritroblaşti bazofili	Eritroblaşti policromatofili	Ertiroblaşti oxifili	Reticulocite	Eritrocite
Diviziunea celulară	+++	+	0	0	0
Sinteza de ADN	+++	++	+	0	0
Sinteza de ARN	+++	++	++	0	0
Prezenţa de ARN	+++	+++	++	+	0
Sinteza proteinelor					
Sinteza lipidelor	+++	+++	++	+	0
Sinteza hemului	+++	+++	++	+	0
Sinteza purinelor şi pirimidinelor	+++	+++	++	+	0
Prezenţa enzimelor respiratorii (ciclul Krebs)	+++	+++	++	+	0
Prezenţa enzimelor glicolitice	+++	+++	+++	++	+
Prezenţa ciclului pentozo-fosfat	+++	+++	+++	++	+
Sinteza mono- şi dinucleotidelor (ATP, NAD, NADP)	+++	+++	+++	++	+

„Combustibilul" de bază care furnizează energia pentru metabolismul eritrocitar este glucoza. Un litru de sînge total consumă într-o oră, la temperatura de 37°, 150—200 mg de glucoză; eritrocitele își epuizează *in vitro* glucoza pe care o conţin, în aproximativ 5—8 ore. Deși leucocitele consumă de 200—1 000 ori mai multă glucoză decît eritrocitele, dat fiind raportul numeric de aproape 1 000 : 1, activitatea glicolitică a sîngelui normal aparţine eritrocitelor; leucocitelor le revine astfel circa 10% din glicoliza totală (103). Descompunerea ei se face după reacţia:



$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O + 674 \text{ kcal.}$$

Prin inhibarea etapelor catalitice la temperatura de +4°C, consumul de glucoză scade pînă aproape de 1%.

Degradarea glucozei în eritrocit se desfășoară în următoarele direcţii:

— *calea glicolizei* sau *calea Embden-Meyerhof-Parnas* numită și *calea anaerobă*, cale pe care se catabolizează circa 90% din glucoza eritrocitară, constituind sursa aproape exclusivă de energie a eritrocitului, și

— *calea oxidativă a pentozei* sau *ciclul Dickens-Hoerecker* prin care se catabolizează restul de circa 10% din glucoză; importanţa acestei căi nu este însă de natură energetică, ci ca furnizoare de hidrogen, necesar în etapele intermediare de reducerea methemoglobinei.

În afara enzimelor angajate în descompunerea glucozei, pe căile arătate mai sus, inclusiv conservarea temporară a energiei degajate din

Scanned with OKEN Scanner

aceasta (sistem de formare a ATP și ATP-aza), în eritrocit mai există o serie de sisteme enzimatice suplimentare ca anhidraza carbonică, enzimele lipido-dependente ale membranei etc. Pînă în prezent au fost identificate circa 50 de enzime grupate în mai multe cicluri, parțial intricate între ele.

După pătrunderea glucozei în eritrocit ea se combină cu o moleculă de acid fosforic, oferită de ATP (fosforilare), dînd naștere unei molecule de glucozo-fosfat și abia după această etapă este dirijată spre una din cele două căi de degradare.

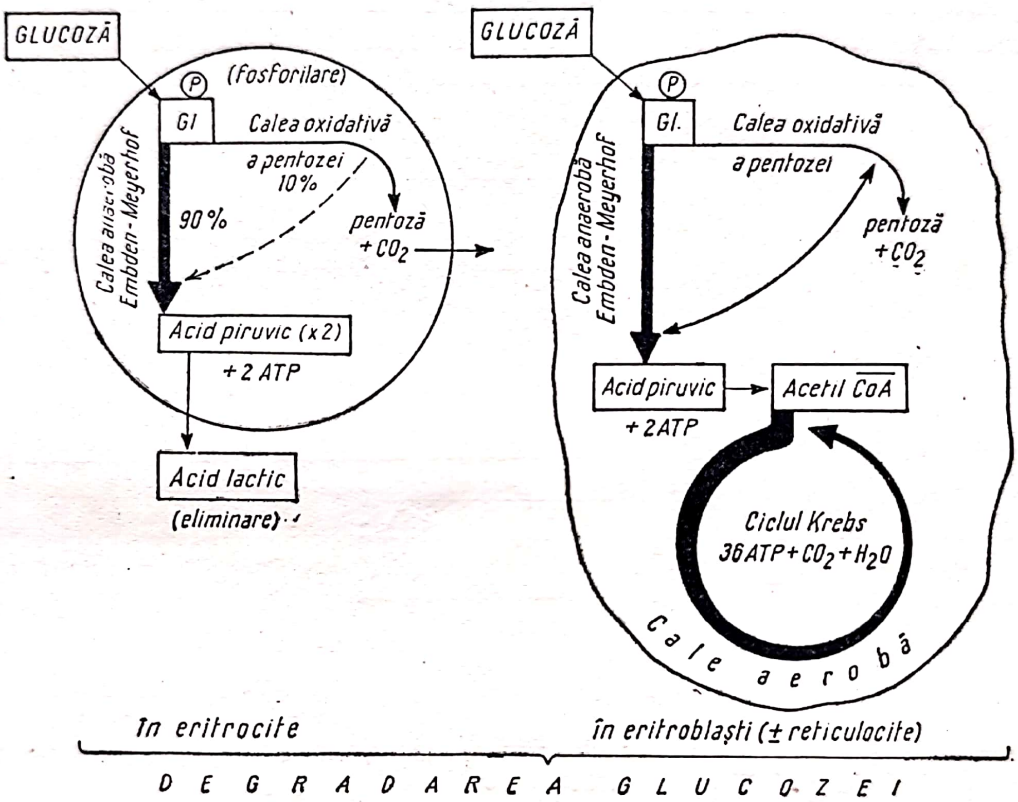


Fig. 4-17. Reprezentare intuitivă a celor două căi de descompunere a glucozei în eritrocite, în comparație cu descompunerea ei în celulele nucleate.

Molecula de glucoză fosfat (Gl.P) este locul de bifurcare catabolică, între cele două căi existînd șunturi. Glicoliza (ciclul Embden-Meyerhof) este comună, atît pentru celulele nucleate, cît și pentru eritrocite.

Randamentul caloric al glicolizei este redus: 2 molecule gram de ATP la o moleculă gram de glucoză (catalizată fără prezența O_2). Continuarea „arderii" glucozei, după etapa de acid piruvic, are loc numai în celulele cu structuri complete sau cel puțin cu mitocondrii (reticulocite) eficiența ei calorică fiind mult mai mare: alte 36 molecule gram de ATP pentru o moleculă gram de glucoză.

Din metabolizarea glucozei pe ambele căi, eritrocitul nu beneficiază decît de mai puțin de 10% din totalul energiei conținute în molecula de glucoză; restul rămîne nevalorificat și se elimină sub formă de acid lactic, întrucît eritrocitul este lipsit de sistemul enzimatic oxidativ (absența ciclului Krebs capabil să catabolizeze mai departe fragmentele de 3 carboni pînă la fragmente de un carbon (CO_2 plus H) (fig. 4-17). Deși

eritrocitul mai conţine (incomplete şi în cantitate redusă) cîteva enzime din ciclul Krebs, prezenţa lor trebuie interpretată ca un vestigiu al activităţii metabolice aerobe din etapa eritroblastică (247).

1. GLICOLIZA

În 1859 Pasteur a descoperit că fermentaţia alcoolică a drojdiei are loc în absenţa totală a oxigenului demonstrînd prin aceasta existenţa unui metabolism anaerob (280).

a. **Etapele intermediare ale ciclului Embden-Meyerhof.** Glucoza pătrunsă în eritrocit suferă, în cadrul sistemului glicolitic Embden-Meyerhof, o serie de 11 transformări succesive, fără intervenţia oxigenului (99, 103, 139, 247, 344) (fig. 4-18).

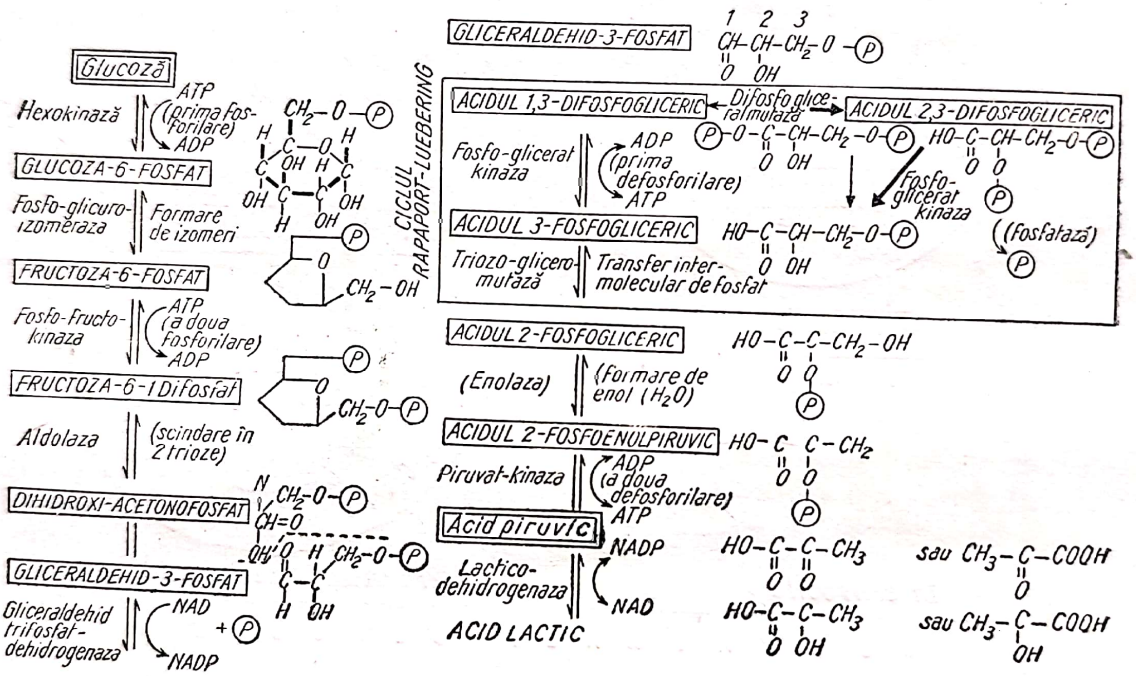


Fig. 4-18. Enzimele şi etapele intermediare ale glicolizei eritrocitare (ciclul Embden-Meyerhof) (în chenarul mare, în dreapta sus, şuntul Rapoport-Luebering).

Cele 11 etape intermediare ale glicolizei sînt următoarele: 1) Glucoza pătrunsă în eritrocit se fosforilează (consum de ATP). 2) Izomerizarea glucozo-6-fosfatului în fructozo-6-fosfat, prin intermediul enzimei fosfohexokinaza. 3) Cu ajutorul altei molecule de ATP esterul fructozo-6-fosfat suferă o nouă fosforilare devenind fructozo-1,6-difosfat. 4) Sub acţiunea aldolazei, activate de ioni de Fe^{++}, Co^{++} şi Zn^{++}, fructozo-difosfatul este scindat, printr-o reacţie de echilibru, în două „trioze": aldehida-fosfoglicerică (de la C_1 la C_3) şi fosfatul de dihidroxi-acetonă (de la C_4 la C_6). 5) Aldehida 3-fosfoglicerică se refosforilează şi dă naştere aldehidei 1,3-difosfoglicerice. 6) Prin acţiunea oxidantă a NAD^+, gruparea aldehidică se dehidrogenează, rezultînd acidul 1,3-difosfogliceric. 7) *Şuntul Rapoport-Luebering.* La acest nivel se intercalează o „meandră" în calea aldehidei 1,3-difosfoglicerice; o mică parte îşi continuă catabolismul printr-o defosforilare catalitică în acid 3-fosfogliceric, prin acţiunea unei fosfokinaze; cea mai mare parte se transformă în acid 2-3 fosfogliceric, prin acţiunea unei mutaze (vezi şi fig. 4—20). 8) Acidul 2-3 fosfogliceric este defosforilat, prin acţiunea unei fosfataze, cu formare de acid 3-fosfogliceric. 9) Un nou transfer intermolecular de fosfat, prin acţiunea unei mutaze (fosfogliceromutaza), din care se obţine acidul 2-fosfogliceric. 10) Sub acţiunea unei enolaze se elimină o moleculă de apă cu formare de acid 2-fosfoenolpiruvic. 11) O nouă defosforilare prin care fosfatul, înserat la acidul enolpiruvic, se retransferă la ATP, cu acumulare importantă de energie din care rezultă acidul piruvic.

Enzimele căii Embden-Meyerhof au fost izolate și în mare parte purificate; unora li se cunoaște chiar și structura chimică. Valorile cantitative ale enzimelor glicolitice precum și activitatea lor enzimatică sînt foarte variate; aceste diferențe sînt în legătură cu reglarea glicolizei, prin modificări în durata și intensitatea de acțiune a enzimelor asupra substraturilor respective. Valori enzimatice scăzute se constată la nivelul HK, PFK și PK, adică ale celor trei kinaze care reglează starea de echilibru a energeticii eritrocitare. Dintre acestea hexokinaza prezintă activitatea cea mai redusă, ea fiind, prin aceasta „dispecerul" care frînează uzura rapidă a eritrocitului, prin limitarea, printr-un mecanism de *feed back*, intrării, pe calea glicolizei, a unei cantități prea mari de substrat (glucoză).

b. **Consecințele metabolice ale glicolizei.** Rezumînd randamentul energetic al „dezmembrării" unei molecule gram de glucoză în eritrocit (în comparație cu catabolizarea ei în precursorii eritrocitari), se poate face următorul calcul: transformarea unui mol de glucoză duce, în prima etapă, la formarea a doi moli de acid piruvic (calea de catalizare folosită fiind ciclul anaerob Embden-Meyerhof). Deși în cursul catabolizării unui mol de glucoză se formează patru moli de ATP (legături macroergice) doar doi reprezintă un cîștig real de energie (14 kcal), ceilalți doi consumîndu-se în cursul a două reacții de fosforilare a hexofosfaților (formarea glucozo-6-fosfatului și a glucozo-1,6-difosfatului. Spre deosebire de glicoliza anaerobă, prin ciclul Krebs se formează, pentru fiecare moleculă de piruvat descompus, cîte 18 legături macroergice; întrucît dintr-o moleculă de glucoză se degajă două molecule de acid piruvic, rezultă 36 molecule de ATP (fig. 4-19),

Din cei 38 de moli de fosfați macroergici obținuți pe ambele căi, organismul cîștigă 266 kcal (38×7); în realitate se obțin 40 kcal dar 2 sînt consumate

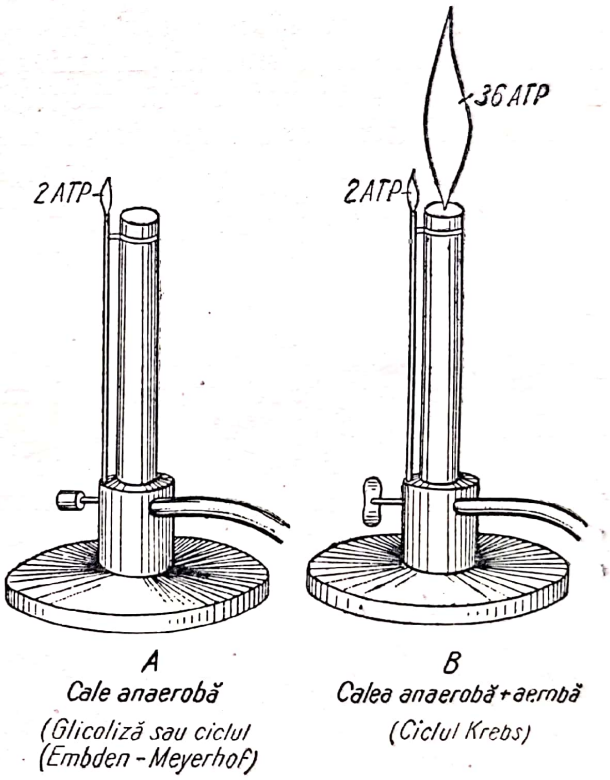


Fig. 4-19. Reprezentare figurativă a randamentului caloric a celor două etape ale catabolismului glucozei: glicoliza (anaerobă) și degradarea oxidativă a glucozei. A. *În glicoliză* — flacăra mică sau veioza — glucoza se descompune în eritrocit pînă la stadiul de acid piruvic (ciclul Embden-Meyerhof); această degradare de energie are un randament scăzut: 2 molecule de ATP, respectiv 14 kcal (2×7, respectiv 1/13 parte din randamentul maxim al energiei eliberabile in vivo de către glucoză).
B. *În ciclul Krebs* — prezent în celulele complete — pe lîngă cele două molecule de ATP se adaugă alte 36 de molecule de fosfat macroergic (flacăra mare a becului), etapa aerobă avînd un randament maxim (38×7=266), oxidarea fiind terminală (CO_2+H_2O). *In vivo* degajarea calorică reprezintă doar 34% din energia potențială a glucozei: *in vitro* (bombă calorică) randamentul este de 674 Kcal (100%).

Scanned with OKEN Scanner

pentru inițierea reacției prin dubla fosforilare a glucozei amintite mai sus. *In vitro* (bombă calorimetrică) glucoza cedează întreaga energie potențială pe care o deține (674 Kcal/mol,), pe cînd *in vivo* organismul poate „extrage" doar 34%, respectiv cele 266 Kcal/mol, restul energiei „intrinseci" pierzîndu-se prin procese de consum intermediar.

În urma transformărilor biochimice care decurg din glicoliză se formează trei substanțe cu rol metabolic de primă importanță pentru funcția respiratorie a eritrocitului: *adenozintrifosfatul* (ATP), cu rol energetic, *difosfogliceratul* (DPG), cu rol de legare labilă a O_2 la molecula de Hb și *nicotinamid-adenil-difosfatul* redus (NADH) cu rol esențial în reducerea MetHb și OxiHb.

1) *Generarea de ATP.* Întrucît eritrocitul nu dispune de o capacitate oxidativă de fosforilare prin sistemul de citrocromi, generarea de ATP poate fi efectuată numai pe calea glicolizei; glucoza (respectiv fructoza), este transformată treptat într-un difosfat prin fixarea de 2 molecule de fosfat anorganic de la ATP (303). Această încărcare inițială de energie este însă dublu compensată printr-un cîștig final tot de 2 molecule de ATP, una la nivelul enzimei fosfogliceratkinaza (PGK) și alta la nivelul piruvatkinazei (PK).

2) *Furnizarea de DPG* (2,3-difosfoglicerat). Acest produs intermediar, obținut în cantitate mare pe calea șuntului Rapoport-Luebering (fig. 4-18), are o importanță specială pentru eritrocitele umane. Ele se formează prin intermediul mutazei care convertește 1,3-DPG în 2,3-DPG (303, 306). Prin acest șunt (neeconomic din punct de vedere energetic), se omite cîștigul a 2 moli de ATP (pentru 2 moli de „trioze"), realizat pe varianta principală (directă), rămînînd doar cîștigul de ATP de la nivelul PK; această irosire de energie este făcută în scopul obținerii de DPG. OxiHb nu poate lega DPG din cauza configurației ei alosterice (încăpere și căi de acces insuficient de spațioase în interiorul moleculei) de aceea se afirmă că între 2,3-DPG și oxigen există o relație de excludere reciprocă (fig. 4-20 precum și fig. 5-13 și fig. 5-14).

3) *Reducerea NAD în NADH.* Prin defosforilările succesive, difosfatul suferă mai multe transformări din care se obține, printre altele, H^+ care este cedat NAD în reacția enzimei GADP (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza). La acest nivel se formează cea mai mare parte a NADH din eritrocitul adult. La rîndul lui, acest H este preluat de methemoglobin-reductază (diaforaza I) care convertește MetHb în OxiHb (vezi și pag. 261). Acțiunea de reducere a GSSG în 2 GSH este secundară însă pe această cale; rolul principal de menținere în stare redusă a acestui tripeptid revine NADPH și diaforazei acestuia (vezi și pag. 260).

Autoreglarea metabolismului eritrocitar și interacțiunile dintre sistemele enzimatice. Reglarea sintezelor prin mecanisme de inducție și represie genică, de primă importanță în celulele nucleate, este fără importanță în eritrocitul matur. Aici nivelul activității metabolice este dependent atît de enzimele rămase în eritrocit după maturarea lui completă (dar care se uzează treptat pe măsura îmbătrînirii), cît și de diverși factori de mediu care adaptează activitatea enzimelor eritrocitare la condi-

Scanned with OKEN Scanner

ţiile de moment. Viteza fiecărei reacţii enzimatice şi cota de participare este rezultanta influenţei reciproce a unui mare număr de factori de interacţiune, care conferă metabolismului eritrocitar un caracter unitar (143).

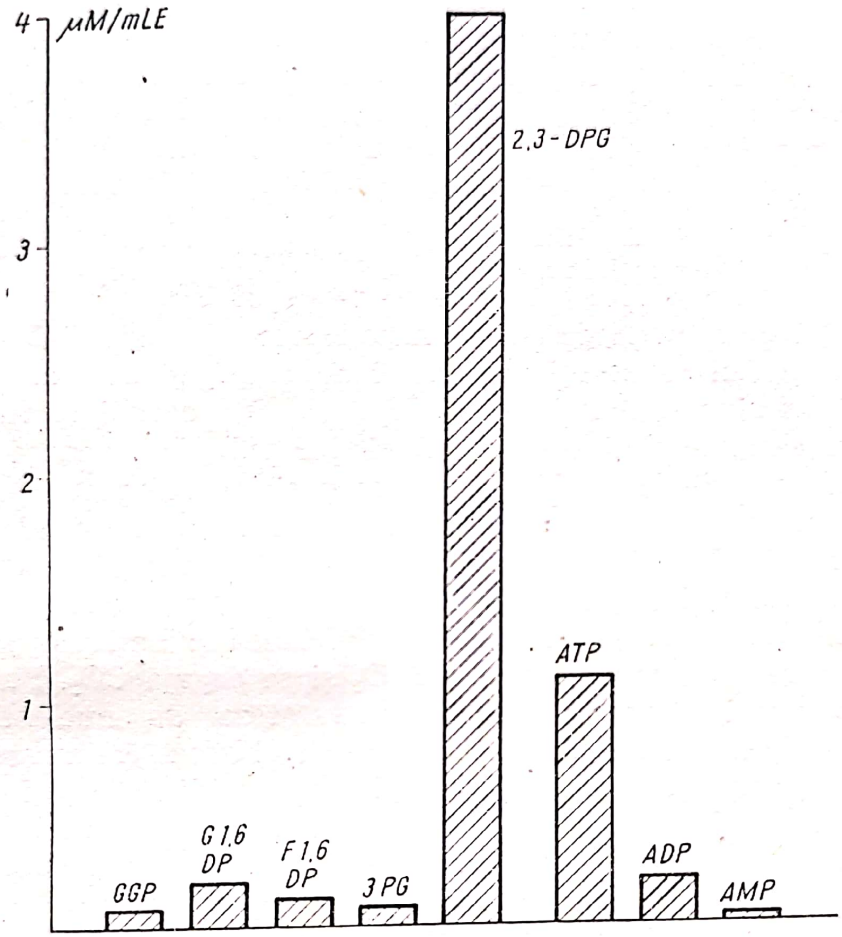


Fig. 4-20. Concentraţiile principalilor compuşi organici fosforilaţi din eritrocite (după C. Bishop şi D. Surgenor, 1964).

Spre deosebire de alte celule, eritrocitele sînt singurele care deţin acidul 2-3 fosfogliceric (DPG) într-o proporţie de 50% din totalul fosforului organic din eritrocite, cu mult mai mult decît toţi ceilalţi 18 compuşi organici fosforilaţi luaţi împreună. Acest produs rezultă din calea derivată (şuntul Rapoport-Luebering). Din acest şunt eritrocitul nu are nici un cîştig energetic, metabolismul lui funcţionează „în gol" („debreiere" sau glicoliză ineficientă). DPG în eritrocitele umane are un rol fundamental în legarea O_2 de Hb printr-un efect alosteric (vezi şi fig. 1-36). Acest produs intermediar al glicolizei se găseşte în aceeaşi concentraţie moleculară ca şi Hb (143, 306).

Produşii finali ai unor reacţii acţionează retroactiv asupra enzimelor „cheie" influenţînd doar etapele iniţiale ale ciclului de reacţii (de exemplu asupra hexokinazei). Modul de acţiune al procesului de retroinhibiţie (*feed-back*) se desfăşoară pe bază de inhibiţie alosterică (vezi şi fig. 1-35). Acest mecanism este foarte eficient întrucît nu necesită prezenţa de substanţe inhibitoare pentru fiecare produs intermediar. După dispariţia produsului final, inhibiţia dispare şi sinteza îşi reia cursul (163).

Scanned with OKEN Scanner

2. CALEA OXIDATIVĂ A PENTOZEI

Cea de a doua cale de degradare a glucozei este calea oxidativă a pentozelor monofosfat, cunoscută și sub denumirea de șunt Dikens-Hoerecker. Deși, pe această cale se degradează numai circa 10% din totalul glucozei eritrocitare catabolizate, ea are o importanță deosebită în protejarea hemoglobinei (și implicit a eritrocitului) împotriva agenților oxidanți; una din cele mai răspîndite și mai grave boli hemolitice induse își are cauza într-un deficit localizat pe această cale metabolică.

Etapele acestui ciclu se reduc la două oxidări în care glucozo-6-fosfatul reprezintă (succesiv) substratul a două enzime oxidante: glucozo-6-fosfat dehidrogenaza (G-6-PD) și 6-fosfo-gluconat-dehidrogenaza (6-P-GD). Din prima oxidare rezultă 6-fosfo-gluconatul, iar din a doua, pe baza unei decarboxilări oxidative, rezultă pentozo-fosfat ribuloza (R-5-P). În urma celor două oxidări se degajă doi atomi de hidrogen de mare importanță metabolică; ei sînt acceptați de NADP, care este coenzima comună a celor două enzime oxidative (G-6-PD și 6-P-GD). Importanța acestei căi constă în faptul că sistemele enzimatice preiau hidrogenul de la glucoză pe care-l predau acestui acceptor oxidat (NADP), care-l oferă apoi glutationului oxidat (GSSG), transformîndu-l în glutation redus (2 GSH) (fig. 4-21). În mod auxiliar, prin intermediul acestui șunt se realizează și mici cantități de fosfo-ribozilpirofosfat (PRPP). Calea oxidativă a pentozei este unica în eritrocit în care se consumă O_2 și se degajă CO_2. Pentoza poate fi utilizată mai departe, fie pentru sinteza de nucleotide (AMP, NADP, NAD), fie pentru retransformarea în hexoze (reintrarea în ciclul glicolitic). În prima eventualitate PRPP, realizat din ribozo-5-fosfat (prin transformarea ATP în ADP), contribuie la sinteza adeninelor nucleotidice, iar în alternativa a doua, din 3 molecule de pentoză pot lua naștere 2 molecule de hexoză și una de trioză.

a. **Glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza** (G-6-PD). Studiul aprofundat al acestei enzime, atît de importante în patologia de masă, a suferit întîrzieri din cauza cantității foarte reduse în care se găsește în eritrocite (1/20 000 din proteinele eritrocitare). Enzima este un tetramer cu o greutate moleculară de circa 200 000; fiecare subunitate este identică, avînd o greutate moleculară de aproximativ 50 000. Prin diluție enzima se disociază, la început, în doi dimeri; la diluții mai mari disocierea este completă.

Gena acestei enzime fiind localizată pe cromozomul X, în caz de deficit de G-6-PD, bărbații nu pot fi decît hemizigoți (neproducători sau producători patologici ai acestei enzime, în timp ce femeile prezintă un mozaicism special, nu un heterozigotism în sensul autozomal); acest mozaicism ține de faptul că inactivarea genelor din cromozomii X ai femeii se face la întîmplare într-o perioadă timpurie a diferențierii eritropoiezei, avînd ca rezultat linii celulare cu G-6-PD normală, și altele cu varianta mutant (vezi și fig. 1-33 și fig. 1-34) (45, 122, 167, 284, 287).

Scanned with OKEN Scanner

Variantele genetice ale G-6-PD. Se cunosc astăzi peste 80 de variante ale G-6-PD, cu activitate normală sau patologică; circa 6 din acestea cuprind peste 95% din cele întîlnite la indivizii cu deficit în această enzimă.

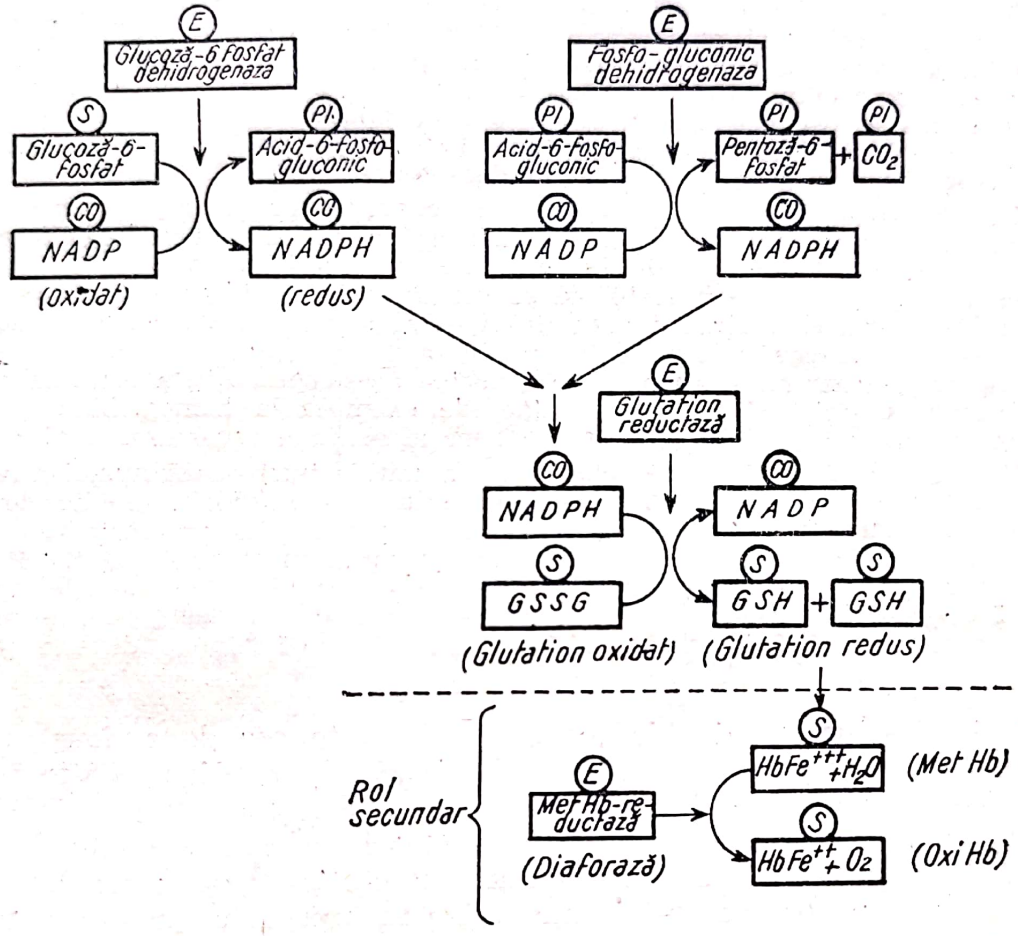


Fig. 4-21. Schemă simplificată a descompunerii glucozei pe calea oxidativă a pentozei fosfat și protejarea antioxidantă a hemoglobinei.
Legendă: E=enzimă; S=substrat; CO=coenzimă; PI=produs intermediar.

Pentru a evita confuziile în identificarea variantelor mutant, comitetul de nomenclatură și standardizare de pe lîngă O.M.S., întrunit la Geneva în 1967, a făcut următoarele recomandări pentru scrierea formulei enzimei normale sau patologice. La început se trece simbolul prescurtat al G-6-PD (Gd); pentru caracterizarea fenotipică (activitatea enzimatică) se vor scrie în continuare, în paranteză, semnele de plus sau minus, după cum urmează: (—)=activitate enzimatică sub 25% din valorile normale (ex. varietatea Mediteraniană cu o activitate de 4% și varietatea A — cu activitate de 15%); (±)=activitate enzimatică cuprinsă între 25 și 65% (ex. varietatea greacă — Rodos — de 25%); (+)=activitatea enzimatică normală cuprinsă între 65 și 150% (ex. varianta normală B de 100%) sau A + de 90%) și (++)=activitate enzimatică de peste 150% (ex. varianta Hektoen cu activitate de circa 500%). Se pot adăuga semne + suplimentare dacă activitatea este foarte crescută. În continuare se înscrie simbolul electroforetic sau geografic al variantei (B, A, A—, mediteraneean etc.). Enzima normală este notată cu majuscula B. În afara unor tipuri mutante de enzimă, notate cu majuscule și semne

aritmetice, comitetul a recomandat (ca și în cazul hemoglobinopatiilor), ca toate variantele nou descoperite să fie notate cu numele orașului sau al spitalului unde au fost constatate (fără nume de țări sau familii) și să se evite numerotările. Pentru a indica genotipul, simbolul Gd se va scrie cu litere italice (cursive), iar numele variantei se adaugă în continuare, indicarea activității prin semnele aritmetice de + sau — se omite la indicarea genotipului. Procedeul este identic și pentru celelalte variante, folosindu-se denumirile respective.

Variantele cele mai răspîndite de G-6-PD sînt: GdA circa 18% și GdA — (circa 12%), ambele la negrii africani și americani (prima fără semne clinice, iar a doua cu semne clinice); Gd mediteraneean este varianta patologică cea mai răspîndită și mai gravă, originară probabil din Mesopotamia și răspîndită la popoarele mediteraneene, Orientul Apropiat, indieni etc., varianta Gd Canton în China etc. Numeroase variante apar sporadic, fiind descrise cazuri familiale izolate.

Se așteaptă ca în viitorul apropiat să se cunoască structura primară completă a lanțurilor polipeptidice ale acestei enzime, iar mutantele să fie identificate după acidul aminat înlocuit și poziția lui în lanțul polipeptidic, astfel unele variante descrise ca entități aparte probabil că se vor dovedi a fi identice. Yoshida (1968) a putut demonstra că enzima mutant tip A — se deosebește de enzima fiziologică (notată cu B), exclusiv printr-un singur acid aminat, acidul aspartic, care a luat locul asparaginei dar nu se cunoaște încă poziția acestei mutații; această substituire este frecvent întîlnită și la alte proteine (de exemplu la hemoglobină). Codonii ARN-m ai asparaginei sînt AAU sau AAC iar ai acidului aspartic GAU sau GAC.

Nu există încă astăzi o idee clară dacă mutațiile interesează numai genele de structură (cum este cazul formei A—), sau există și mutații ale genelor de aranjament (ca în sindromul talasemic), din care să rezulte tulburări enzimatice cantitative (ca sinteze scăzute sau în exces). De exemplu în varianta B tip Hektoen există o creștere a activității enzimatice de 4—5 ori față de valorile normale (circa 500%), iar în varianta A tip Herford — o creștere de 200% față de normal, fiecare variantă avînd, la rîndul ei, caracteristici fizico-chimice diferite (41, 44, 143, 166).

b. **Fosfo-gluconat dehidrogenaza** (PGD) este cea de a doua enzimă din șuntul pentozo-fosfatului. Ea catalizează decarboxilarea 6-fosfo-gluconatului în ribulozo-5-fosfat, cu formarea unei molecule de NADPH. Greutatea moleculară a enzimei din eritrocitele normale este de circa 80 000. Structural, ea este alcătuită din 2 subunități egale (dimeri). Genetic este localizată și ea, pe cromozomul X. Din această enzimă se cunoaște de asemenea, un număr de variante din care mai bine studiate sînt 6 variante fenotipice eritrocitare. Cazurile de deficit al acestei enzime, cu manifestări morbide, sînt extrem de rare.

3. SINTEZA GLUTATIONULUI ȘI MENȚINEREA LUI SUB FORMĂ REDUSĂ

a. **Glutationul** este un tripeptid alcătuit din acid glutamic, cisteină și glicocol; el poate fi ușor dehidratat transformîndu-se într-un disulfid: 2 GSH → GSSG (fig. 4-22). În eritrocite se găsește într-o proporție de 60—80 mg% (247). Deși este un peptid (oligopeptid), glutationul nu se sintetizează prin intermediul ARNm și a ribozomilor, ci enzimatic. Eritrocitele posedă echipamentul enzimatic necesar pentru biosinteza lui. Primul pas în sinteza acestuia este formarea unui dipeptid (acid glutamic + cisteină + ATP → glutamil—cistein + ADP + P) sub acțiunea unei sintetaze și a ionilor de Mg^{++}. În a doua etapă, din dipeptidul format + gli-

Scanned with OKEN Scanner

cină+ATP, sub acţiunea altei sinteze şi a ionilor de Mg^{++} şi de K^{+}, rezultă glutation+ADP+fosfat.

În anumite împrejurări patologice pot apărea tulburări în sinteza glutationului, ale cărei cauze pot ţine fie de scăderea pătrunderii acizilor aminaţi prin membrana eritrocitară, fie de scăderea rezervelor de ATP sau de deficitul uneia din enzime.

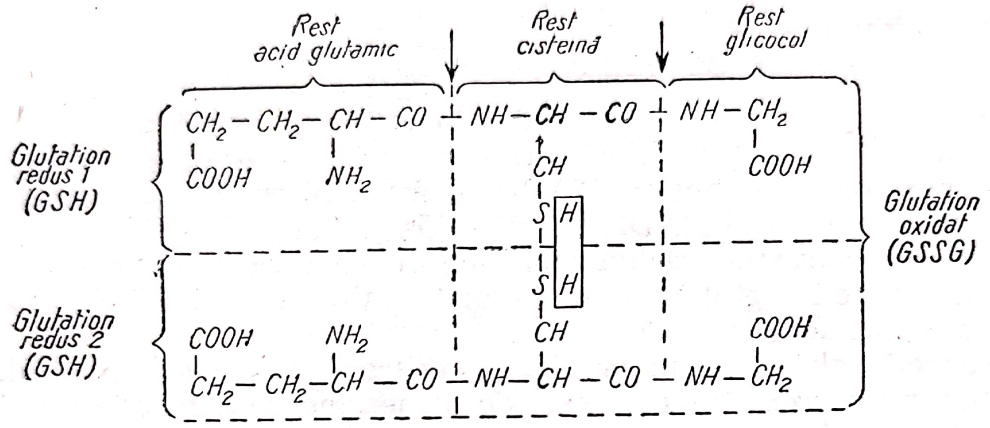


Fig. 4-22. Structura chimică a glutationului redus şi oxidat.

Glutationul redus (GSH) este un tripeptid format din acid glutamic, cisteină şi glicocol (săgeţile arată legăturile peptidice între acizii aminaţi). Forma oxidată (GSSG) rezultă din fuzionarea a două molecule de glutation redus prin pierderea, de fiecare parte, a unui atom de H din grupul „tio" (—SH) al cisteinei şi formarea de legături disulfidice (—S—S—).

Rolul glutationului în eritrocite este de coenzimă reductoare. Glutationul redus protejează componenta proteică a hemoglobinei şi a altor proteine împotriva proceselor oxidative urmate eventual de formarea corpilor Heinz. Menţinerea în stare redusă a grupărilor sulfidice (—SH) este una din condiţiile de bază ale supravieţuirii eritrocitare; transformarea acestor grupări în forme oxidate atrage după sine sechestrarea splenică a eritrocitelor (303).

Există numeroşi produşi oxidanţi care duc la pierderea activităţii acestui sistem reductor prin oxidarea grupărilor —SH sau blocarea lor, cum sînt metalele grele, substanţele alkilante, unele droguri ca fenilhidrazina, derivaţii de anilină şi chiar oxigenul ca atare (143). Procesul de „învechire" a Hb (HbA_3) şi a altor proteine celulare include oxidarea grupărilor tiol.

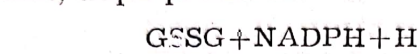
b. **Enzimele legate de sinteza şi funcţiile glutationului.** Enzimele care intervin în cele două etape ale sintezei glutationului sînt glutamil-cistein-sintetaza şi glutation-sintetaza (vezi fig. 4-22); în plus, în activitatea metabolică a glutationului, activează glutation-peroxidaza şi glutation-reductaza.

Glutation-peroxidaza. Glutationul protejează unele componente eritrocitare împotriva peroxizilor prin sustragerea H_2O_2 prin intermediul glutation-peroxidazei, după procesul:

$$H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$$

La rîndul lui GSSG format este redus de NADPH, protejarea acestui tripeptid fiind „placa turnantă" împotriva agresiunii unui număr mare de agenţi oxidanţi.

Glutation-reductaza eritrocitară. Glutationul eritrocitar se găseşte în proporţie de 98%; în stare redusă el trece însă foarte uşor în forma oxidată. Condiţia menţinerii lui în stare redusă este aportul permanent de hidrogen, asigurat de o bună funcţionare a sistemului reductor al căii pentozo-fosfat, după procesul:



$$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$$

În toate ţesuturile, dar mai ales în eritrocit, există un sistem enzimatic capabil să reducă GSSG; acest sistem nu acţionează decît în prezenţa unor coenzime, anume NADPH (căruia îi revine aproximativ 85—90% din activitate) şi NADH (cu 10—15%). Importanţa NADPH în eritrocitul matur trebuie văzută mai ales în legătură cu funcţia de coferment al reducţiei glutationului şi mai puţin în legătură cu diaforaza NADPH-dependentă (162, 247, 303).

Reducţia glutationului are loc în eritrocit sub acţiunea catalitică a glutation-reductazei. Rolul ei este de a menţine concentraţia de GSH la un nivel destul de ridicat pentru a face faţă unor agresiuni oxidative (care duc la formarea de peroxid). S-a putut realiza în prezent o concentrare a enzimei de 18 000 de ori faţă de aceea din hemolizatul simplu; structura ei este tot o flavoproteină de tip FAD. Glutation-reductaza este activabilă printr-un factor stromal; contrar G-6-PD, activitatea ei nu scade în cursul îmbătrînirii eritrocitare. Au fost descrise cazurile de deficit de glutation-reductază.

4. COENZIMELE REDUCTOARE ŞI DIAFORAZELE

a. **Coenzimele reductoare** (NADH şi NADPH). Hemoglobina, o serie de enzime eritrocitare şi anumite componente ale membranei sînt foarte sensibile la oxidare. În condiţii fiziologice, dar mai ales patologice, în eritrocit apar substanţe oxidante sau care pot media oxidarea prin transportul de oxigen molecular. Viabilitatea eritrocitului este legată de capacitatea de a anihila aceste oxidări prin sinteza unor echivalente reductoare.

Cele două coenzime reductoare, sintetizate în eritrocit, se cuplează astfel: NADH cu lanţul glicolitic (Embden—Meyerhof), iar NADPH cu ciclul pentozo-fosfat. În eritrocit NADH are două funcţii: prima şi cea mai importantă este de a reduce, cu ajutorul enzimei specifice (diaforaza I) methemoglobina în hemoglobină, iar a doua, cu rol secundar, este de a contribui, într-o proporţie de circa 20%, la reducerea glutationului oxidat. NADPH îndeplineşte în eritrocit, tot două funcţii: prima şi cea mai importantă este de a reduce, cu ajutorul glutationreductazei, glutationul oxidat în glutation redus, iar a doua, cu rol minor, de a contribui, cu ajutorul enzimei specifice (diaforeza II) la reducerea MetHb în Hb. Pentru menţinerea unui echilibru între cantitatea de NAD şi NADP, în eritrocitul normal există o cale „flexibilă" de conversie reciprocă între

Scanned with OKEN Scanner

aceste două enzime, numită calea sau *suntul Touster* (303). Aceste coenzime nu pot acționa singure ci numai prin intermediul enzimelor specifice pentru fiecare sistem reductor în parte, numite diaforaze.

b. **Diaforazele eritrocitare** sînt enzime cu rol reductor. Acțiunea lor — exercitată prin intermediul coenzimelor — constă în „pilotarea" activității transporturilor de hidrogen de la un substrat oarecare la altul, ambele (apo)enzime purtînd încă și denumirea veche de „diaforaze" (de la cuv. gr. *dia*=prin și *ferein*=a purta). Au fost descoperite cazuri de deficit ale unora sau altora din diaforaze. Astăzi se cunosc multe din proprietățile fizico-chimice și biologice ale diaforazelor (247).

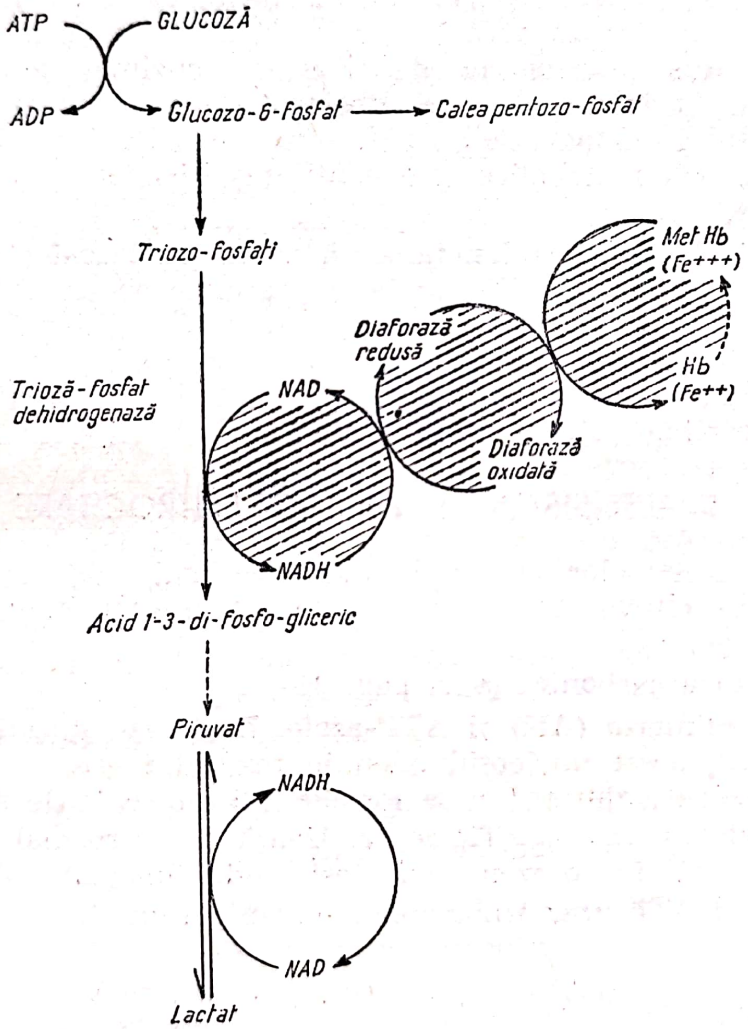


Fig. 4-23. Reducerea methemoglobinei pe cale glicolitică de către NADH-diaforază 1 (modalitatea dominantă).

NADH-diaforaza este enzima care asigură transportul hidrogenului de la NADH la Hb. Deși în eritrocit are loc permanent formare spontană de MetHb, aceasta este redusă cu atîta eficiență încît în mod normal nivelul ei nu depășește 1% din totalul Hb.

Scanned with OKEN Scanner

Enzima a putut fi purificată pînă la o concentrație de 50 000 de ori mai mare decît în hemolizatul brut. S-a stabilit că este o flavoproteină de tip FAD. Unele lucrări postulează existența a două tipuri de NADH-diaforază. Cantitatea cea mai mare de methemoglobină este redusă de diaforaza I; cea de a doua methemoglobin-reductază, dependentă de NADH, ar contribui cu reducerea a numai 5% din methemoglobina formată. Numeroase date experimentale atestă faptul că reducția MetHb în eritrocite are loc (în condiții fiziologice) aproape exclusiv prin NADH, contribuția NADPH fiind neînsemnată (fig. 4-23).

NADPH-dehidrogeneza sau NADPH-diaforaza. În 1928 Harrop și Barron au observat creșterea consumului de oxigen în eritrocitele incubate în soluție de glucoză dacă li se adaugă albastru de metilen, constatare care a dus ulterior la descoperirea enzimei glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza. Astăzi se știe că albastrul de metilen stimulează calea pentozo-fosfatului ducînd la o reoxidare rapidă a NADPH. Factorul limitant al acestei căi metabolice este cantitatea disponibilă de NADP sub formă oxidată.

Persoanele la care nu funcționează ciclul pentazo-fosfatului (purtătorii unui deficit de G-6-PD), nu beneficiază de acest mecanism de reducere. Ele nu au totuși o concentrație crescută de MetHb, ceea ce dovedește că acest sistem enzimatic, cu rol primordial în reducerea glutationului, are un rol secundar în reducerea MetHb (în condițiile în care ritmul producerii de MetHb nu este crescut).

5. ALTE SISTEME ENZIMATICE ERITROCITARE

În afara sistemelor enzimatice descrise mai sus, eritrocitul mai dispune de alte cîteva enzime, care îi permit o mai bună integrare în metabolismul general.

a. **Anhidraza carbonică** (vezi pag. 240)

b. **Adenilatkinaza (AK) și ATP-azele.** Deși prin glicoliză nu se sintetizează AMP, acest nucleotid adenilic fosforilat este produs de către adenilat-kinază; cu ajutorul ei se formează 2 molecule de ADP. Procesul invers, de defosforilare a ATP se realizează de către mai multe enzime ATP-azice; pînă în prezent au fost individualizate două sisteme: S-ATP-aza și I-ATP-aza. Ambele enzime sînt intim atașate de membrana eritrocitară.

S-ATP-aza sau ATP-aza „senzitivă" numită și Na, K-ATP-aza, este inhibată de către glicozizii digitalici ca ouabaina. Ea necesită, pentru activare, prezența de Na^+, K^+ și Mg^{++}. Substraturile ei sînt ATP, precum și K^+ extracelular și Na^+ intracelular. Rolul ei este de a menține un nivel intracelular ridicat de K^+ și altul scăzut de Na^+, prin pomparea, contra gradientului de membrană, a acestor doi cationi (vezi și pag. 265).

I-ATP-aza numită și ATP-aza ouabain insensibilă este mai puțin studiată; ea pare să răspundă de menținerea formei biconcave și de capacitatea de deformare a eritrocitului (303).

Scanned with OKEN Scanner

B. CONSECINŢELE METABOLICE ALE CATABOLISMULUI ERITROCITAR

Specializate în transportul O_2 şi CO_2, eritrocitele şi-au simplificat corespunzător structurile şi funcţiile celulare, păstrînd, ca elemente de bază, membrana care le protejează mediul intracelular (cu care controlează schimburile de substanţe cu mediul extracelular) şi un aparat biochimic specializat. Acesta este adaptat, în primul rînd, pentru protecţia împotriva degradărilor oxidative.

1. REDUCEREA METHEMOGLOBINEI

Menţinerea Hb în stare funcţională constă, în primul rînd, în menţinerea fierului hemoglobinei în stare bivalentă. Sub această formă Hb poate intra în legătură labilă cu O_2. Spre deosebire de MetHb, OxiHb este o Hb oxigenată dar nu oxidată.

Hb se oxidează pe următoarele căi: autointoxicare, acţiunea directă a oxidanţilor, acţiunea anumitor donatori de H în prezenţa O_2 (ex. coloranţii de anilină), formarea unor complexe din moleculele de Hb şi alte substanţe (cu creşterea sensibilităţii faţă de O_2) etc. Pentru a fi funcţională, Hb trebuie protejată contra agenţilor oxidanţi. Există patru căi de reducere a MetHb în Hb, toate legate de regenerarea piridin-nucleotidelor; cel mai important mecanism este legat de calea glicolitică anaerobă (Embden-Meyerhof): NADH plus diaforaza ei (NADH—MetHb R). După Scott şi colab. (1965), proporţia dintre rata celor patru căi reductoare ar fi următoarea: 67% prin NADH—MetHb R, 5% prin NADPH—MetHb R, 16% prin acidul ascorbic şi 12% prin GSH.

Un efect catalitic important pentru reducerea MetHb îl are albastrul de metilen, precum şi alţi coloranţi. Acest sistem reductor este legat de generarea NADPH pe calea oxidativă a pentozei, devenind o NADPH-dehidrogenază nefiziologică (artificială).

2. HOMEOSTAZIA COMPUŞILOR IONICI
(„pompa de sodiu" a eritrocitului)

Concentraţia electroliţilor în interiorul eritrocitului este mult diferită de aceea din plasmă; astfel Na^+ are o concentraţie eritrocitară de numai 16 mEq/l faţă de concentraţia plasmatică de 144 mEq/l, în timp ce concentraţia intracelulară a K^+ este de 90—110 mEq/l faţă de concentraţia plasmatică de 5 mEq/l. Eritrocitele conţin, deci, de circa 20 de ori mai mult K^+ şi de circa 10 ori mai puţin Na^+ decît plasma. Faţă de aceste valori, în sferocitoza ereditară pătrunderea pasivă a Na^+ în eritrocit este de circa două ori mai mare (fig. 4-24) (135, 137, 139).

În transportul activ de ioni, reglarea volumului eritrocitar are la bază fenomenul cunoscut sub denumirea de „pompă ionică" sau „pompă de sodiu", în absenţa lui influxul liber de ioni şi de apă are ca efect

Scanned with OKEN Scanner

tumefierea și liza osmotică a celulei. Funcționarea acestei pompe în dublu sens este una din sarcinile principale ale metabolismului eritrocitar.

Energia necesară pentru menținerea acestor concentrații diferențiate prin mecanisme active este furnizată de glucoză și înmagazinată apoi în moleculele de ATP. 54% din energia eliberată de ATP în eritrocit este folosită pentru menținerea repartizării fiziologice a Na^+ și K^+ (247). Miș-

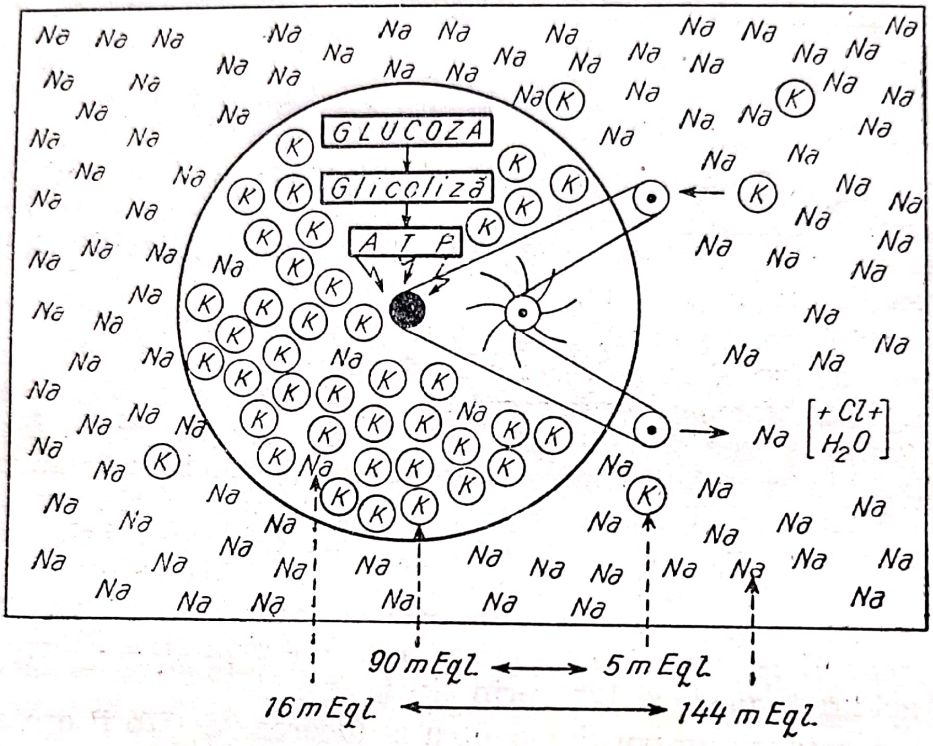


Fig. 4-24. Reprezentarea figurativă a „pompei de ioni" din eritrocitul matur (după Heilmeyer L., 1968).

Marile diferențe de concentrație între ionii Na^+ și K^+ de o parte și de alta a membranei nu se datoresc diferențelor de permeabilitate a membranei celulare pentru aceștia, ci unui transport activ cu consum important de energie. Pe baza energiei furnizate de glucoză (predominant în glicoliză), se realizează transportul de Na+ în afara eritrocitului și de K^+ înăuntrul lui. O dată cu scăderea ATP scade cîștigul de energie, Na^+ pătrunde în eritrocit, atrage după el apa, eritrocitul devine sferoid (fază prehemolitică). Factorii răspunzători de transportul Na^+ și K^+ rezidă exclusiv la nivelul membranei; ei sînt factori ATP-azici.

carea inversă a ionilor (conformă cu gradientul de concentrație), apare ca un reflux pasiv, fără consum de energie. Eritrocitele în care acest sistem funcționează defectuos, pierd K^+ și acumulează Na^+, rezultînd scurtarea duratei lor de viață. „Pompa de ioni" este inactivată de anumiți inhibitori ai unor enzime care blochează scinderea moleculei de ATP. Este dovedită existența unui raport direct între consumul de ATP și concentrația cationilor din eritrocite. Inhibarea glicolizei duce la inhibarea transportului activ, scăderea ATP, pierderea de K^+ și influx de Na^+ în eritrocit (137).

După Salmon, Glynn și alții (1959), numărul locurilor pe suprafața unui eritrocit în care are loc schimbul de ioni este limitat (10^3—10^4, față de 10^5 pentru apă). Tosteson și colab. evidențiază pe membrană zone active plurienzimatice legate de lanțul transportor, precum și inhibitori ai transportului, numărul lor evaluîndu-se la circa 2 000 pentru un eritrocit (135, 143). În sprijinul transportului preferențial ar pleda localizarea asimetrică a unor enzime în structura membranei care ar cataliza cu mai multă ușurință o reacție cînd substratul vine dintr-o parte a membranei și nu din partea opusă (137).

După ipoteza lui Hokin (1963) transportul cationilor s-ar efectua activ de către anumiți „cărăuși" moleculari, care sînt însăși lipoproteinele ce alcătuiesc membrana. Aceste complexe moleculare, după ce captează cationul (Na sau K) rotează dinspre suprafața externă spre fața internă a membranei și invers, depunînd cationul cuplat, fie intra- fie extraeritrocitar (translocație). Transportul ionilor Na^+ sau K^+ are la o bază o reacție de fosforilare sau defosforilare: preluare de fosfat anorganic de la molecula de ATP sau cedarea lui moleculei de ADP cu ajutorul a două enzime dependente de Mg; (S-ATP-aza); astfel ATP formează centrul activ al pompei ionice, iar mediatorul care preia și cedează Na^+ și K^+ ar fi un constituent lipo-proteic al membranei (vezi și pag. 265).

O altă părere în legătură cu traversarea diferențiată a cationilor prin membrana eritrocitară este bazată pe existența unui potențial redox. Conform acestei teorii, se formează două sisteme oxido-reductoare de o parte și de alta a membranei; curentul de electroni format creează o tensiune electromotoare locală care antrenează cationii. În felul acesta nu ar fi necesară acceptarea unui transport enzimatic al acestor cationi. Funcționarea pompei de sodiu s-ar desfășura pe principiul pilei electrice cu combustibil, membrana eritrocitară fiind puternic polarizată, cu diferențe importante de potențial între exterior și interior, curentul ionic ar fi într-un permanent circuit (teoria Eyrand) (116).

Rațiunea consumului unei cantități atît de mari de energie pentru menținerea în stare de funcționare optimă a pompei de sodiu nu a fost găsită pînă în prezent. În nici un caz nu hidrofilia mai mare a Na^+ față de K^+ este cauza sferocitozei în cazurile de alterare a acestei pompe. Anumite mamifere prezintă un nivel scăzut de K eritrocitar (ca pisica, cîinele, vaca, cerbul și altele), pe cînd la altele (oi și capra) nivelul este, în unele crescut, iar în altele scăzut; mieii și viteii prezintă la naștere concentrații crescute de K^+ pentru ca ulterior să se ajungă la valorile animalelor mature (303).

3. MENȚINEREA FORMEI DISCOIDALE A ERITROCITULUI

Rolul principal în menținerea formei discoidale a eritrocitului îl deține membrana; forma biconcavă îi asigură supleța de a se strecura prin canalicule capilare, care, adeseori, au un diametru mai mic decît cel propriu, după care își revin la forma lor inițială. Menținerea acestui „tonus" și a marii plasticități eritrocitare a dus la părerea existenței în membrană a unor produși proteici contractili. Ohniski și Kamamura (1963) ar fi extras din membrana eritrocitară un complex proteic compus dintr-o eritroactină și o eritromiozină, activabil prin cefaline. Aceste substanțe ar fi, după părerea autorilor, răspunzătoare și de transportul activ al Na^+ și K^+ și ar avea o acțiune ATP-azică și contractilă.

Alte cercetări tind să explice instalarea rigidității eritrocitare prin modificări ale structurii membranei (analogă cu scleroza vasculară). Este descrisă de către Wells o entitate morbidă denumită „sindrom de

Scanned with OKEN Scanner

sclerodermie ereditară". Alte date experimentale caută să demonstreze capacitatea transportoare de fibrinogen a eritrocitelor. P. Teitel (1970) presupune un mecanism de calcifiere a membranei: prin scăderea ATP eritrocitar în unele anemii enzimopenice (de deficitul de piruvatkinază) sau prin conservarea sîngelui, s-ar favoriza depunerea calciului pe suprafața membranei eritrocitare (306).

Alte cercetări (Nakao și Yoshikowa, 1961, Weed și Lacelle, 1969) au demonstrat că forma biconcavă a eritrocitului este legată de prezența ATP, deoarece în cursul conservării sîngelui (îmbătrînire forțată), cînd scade concentrația de ATP, eritrocitul ia o formă crenelată, apoi sferică. Apariția acestor alterări morfologice începe să se evidențieze cînd concentrația de ATP scade sub 50%. Prin incubarea unor astfel de celule sferice în soluție de adenină și inozină, poate avea loc restituția de ATP și implicit revenirea eritrocitelor la forma discoidală (21).

Intoxicarea eritrocitelor proaspete cu fluorură (substanță inhibitoare a enolazei și implicit a glicolizei) duce de asemenea la formarea de sferocite, iar incubarea ulterioară cu adenină și inozină (după spălarea fluorurii) face să reapară forma biconcavă. Chiar „fantomele" eritrocitare („ghosts"), formate din membrană după golirea prin soluție hipotonă a conținutului iau, după adaos de ATP, formă biconcavă. Peste 1/3 din conținutul normal de ATP al eritrocitului pare necesar pentru menținerea formei discoidale normale.

Cercetările moderne leagă capacitatea eritrocitului de a se strecura prin spații înguste, de existența în membrana acestuia a proteinei de aspect fibrilar numită *spectrină*. Aceasta ar putea fi analogă cu actina musculară sau trombostenina trombocitară. Anomaliile genetice ale structurii acestei proteine (ex. sferocitoza ereditară) va duce la restrîngerea grupărilor —SH, ceea ce ar perturba agregarea subunităților peptidice în microfilamente (158 b). Anomalia implică următoarele perturbări fizico-chimice și metabolice asupra eritrocitului:

— modificări de volum, formă, elasticitate, încărcare electrică etc.;

— desprinderi de fragmente lipidice de pe membrană prin fragilizarea legăturilor dintre lipide și proteine, ceea ce duce la o scădere a raportului dintre suprafață și membrană cu apariția de microsferocite; acestea, deși sînt mai mici, devin mai rigide și în același timp mai fragile;

— creșterea permeabilității membranei pentru cationii monovalenți (Na^+ și K^+) care, în cantități normale, pătrund cu dificultate în interiorul eritrocitului datorită barierei ionilor de calciu bivalenți; pentru menținerea între Na și K a unui raport diferit de gradientul osmotic, este necesară prezența pompei ionice care să expulzeze un atom de Na^+ în schimbul unuia de K^+.

Energia degajată prin glicoliză și depozitată în moleculele de ATP este folosită de către „pompa de sodiu" prin cuplarea la un sistem enzimatic numit ATP-azic. În sferocitoza ereditară fiind alterată însăși structura eritrocitară, Na^+ pătrunde cu mai multă ușurință în eritrocit, iar

Scanned with OKEN Scanner

prezența sa suplimentară atrage un exces de apă care imprimă eritrocitului forma sa „sferică". Pentru a reechilibra excesul hidro-sodat, sistemul ATP-azic funcționează accelerat, ajungîndu-se la un deficit rapid de ATP; aceasta stimulează glicoliza care duce mai devreme la uzura enzimelor eritrocitare, ele neputînd fi reînnoite din lipsa nucleului și a ribozomilor.

Moleculele de ATP fiind și chelatori de Ca^{++}, prin deficitul de ATP se ajunge la creșterea nivelului de Ca^{++}, atît din membrană cît și din interiorul eritrocitului. Excesul de Ca^{++} din membrană ar duce la un gen de „sclerozare" a eritrocitului, iar cel din interior la o transformare sol-gel a hemoglobinei submembranare, ambele mărind rigiditatea eritrocitară.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 5

HEMOGLOBINA

Hemoglobina este o heteroproteină compusă dintr-o grupare proteică incoloră, globina, care reprezintă aproximativ 96% din greutatea ei moleculară și dintr-o grupare prostetică colorată, hemul, care formează restul de 4%. Molecula de hemoglobină este un tetramer alcătuit din două perechi neidentice, dar simetrice de monomeri. Un monomer de hemoglobină, alcătuit din cuplul proteină-grup prostetic (globină+hem), are o greutate moleculară de circa 16 000 (117, 139, 243, 256). Greutatea moleculară a hemoglobinei este de 64 500; din aceasta doar circa 600 revine cîte unei grupări hem, din care 56 cîte unui atom de fier. Din cei circa 10 000 de atomi pe care îi conține, circa 100 aparțin celor patru grupări hem, iar din aceștia numai 4 atomi revin fierului (fig. 5-1).

Hemoglobina este o cromoproteidă. Cromoproteidele sînt proteine conjugate, compuse dintr-o proteină și o grupare prostetică colorată, în cazul nostru o metalo-porfirină (39).

I. COMPONENTA PROSTETICĂ A HEMOGLOBINEI: HEMUL

A. STRUCTURA ȘI BIOSINTEZA PORFIRINELOR

Grupul prostetic al moleculei de hemoglobină este reprezentat de hem. Acesta este alcătuit dintr-o componentă organică azotată, protoporfirină, și o componentă metalică, atomul de fier, ansamblul fiind o feroprotoporfirină (79, 125).

Porfirinele sînt pigmenți nemetalici care au ca structură de bază un inel format din 4 grupări pirolice unite prin 4 punți de meten, iar atomii de H periferici ai pirolilor sînt înlocuiți prin diverse grupări funcționale, realizînd variate forme de porfirine.

Scanned with OKEN Scanner

Porfirinele, prin răspîndirea lor mare în natură și prin numeroasele lor funcții metabolice, au un rol primordial în dezvoltarea și menținerea vieții. După Rittenberg, viața nu ar fi putut apărea fără sinteza porfirinelor. Cei doi pigmenți pirolici, hemul și clorofila (al cărei metal este magneziul), stau la baza proceselor vitale ale regnului animal și vegetal.

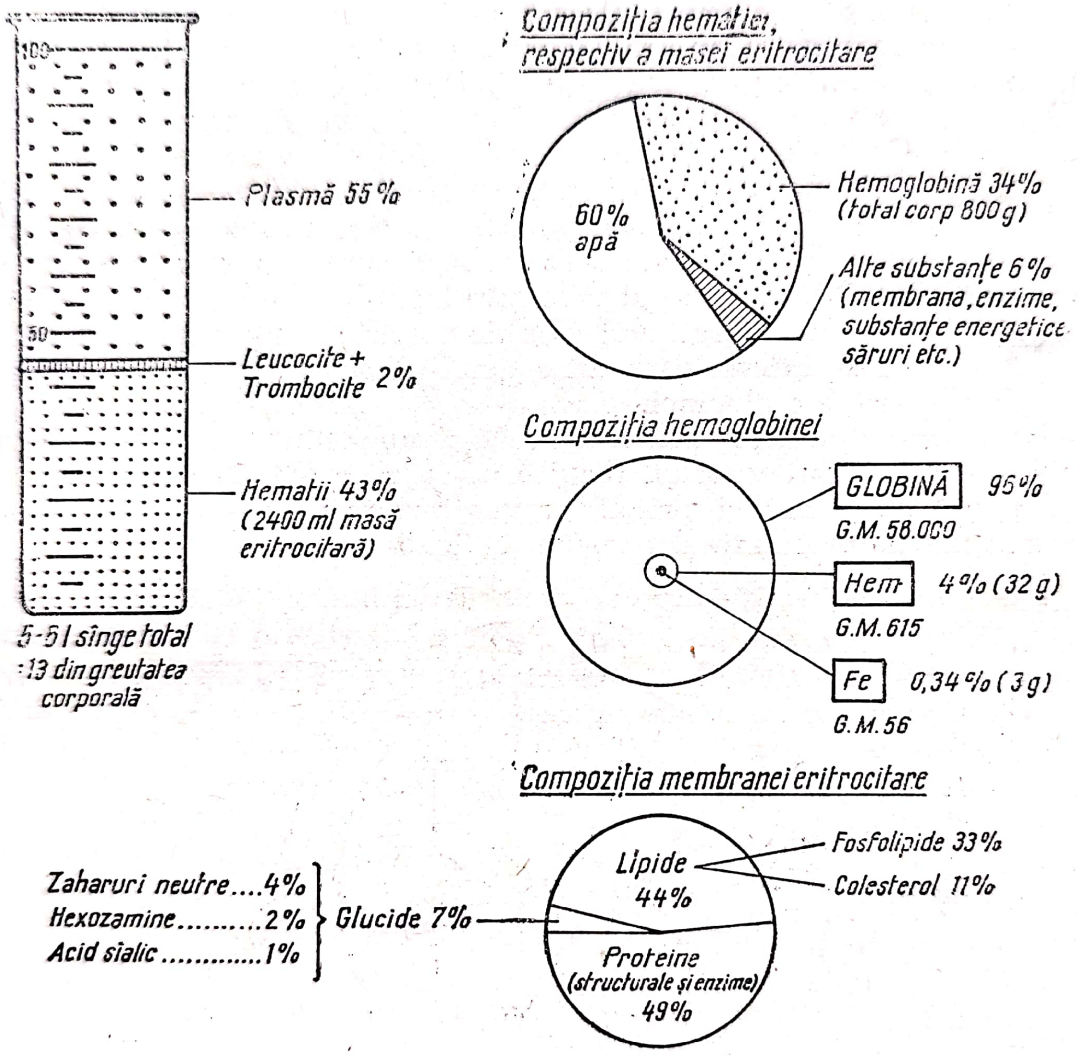


Fig. 5-1. Reprezentarea sinoptică a unor valori și rapoarte ale eritronului.

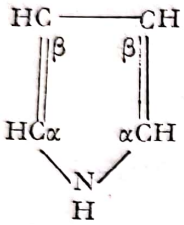
În natura înconjurătoare și în organismul uman porfirinele se găsesc în stare liberă sau în diferite combinații. În organismele vii porfirinele libere se găsesc în cantitate infimă față de cele combinate. Cea mai mare cantitate de porfirine libere se găsește în produsele de excreție (urină și materii fecale), iar în cantități mai reduse se găsesc și în eritroblești, eritrocite, precum și în celelalte celule și în plasmă; chiar sistemul nervos conține cantități foarte mici de porfirine (2, 79, 103, 117, 138).

În denumirea tipurilor de porfirine Hans Fischer s-a referit la mediul în care a fost identificat pentru prima oară produsul tetrapirolic;

uro- și coproporfirinele nu sînt însă decît etape intermediare ale sintezei produsului final care este protoporfirina; nici una din aceste porfirine nu este produsul specific de excreție pentru urină sau fecale.

1. STRUCTURA CHIMICĂ A PORFIRINELOR

Porfirina are în componența sa un inel central tetrapirolic, numit porfină, care reprezintă un schelet cu o structură fixă pentru toate porfirinele din regnul animal sau vegetal. Pirolul este un pentaciclu nesaturat format din 4 atomi de carbon și un atom de azot (heterociclu).



Carbonii proximali au fost notați cu α iar cei distali cu β. Cele patru grupări pirolice se leagă între ele (prin atomii de C din poziția α), prin cîte o punte meten (—C=). Molecula de porfirină nu există în natură ca atare; ea a fost sintetizată în laborator în jurul anului 1935 de Hans Fischer.

Structural, molecula de porfirină este dispusă în platou; ea se intercalează între două pliuri ale lanțurilor polipeptidice ale globinei.

Prin înlocuirea celor 8 atomi de H ai nucleului tetrapirolic din pozițiile β prin diferiți radicali, rezultă porfirinele (53, 117, 163, 194, 243, 279). În sinteza porfirinei, primul produs care ia naștere din condensarea precursorilor naturali, este uroporfirina (fig. 5-2).

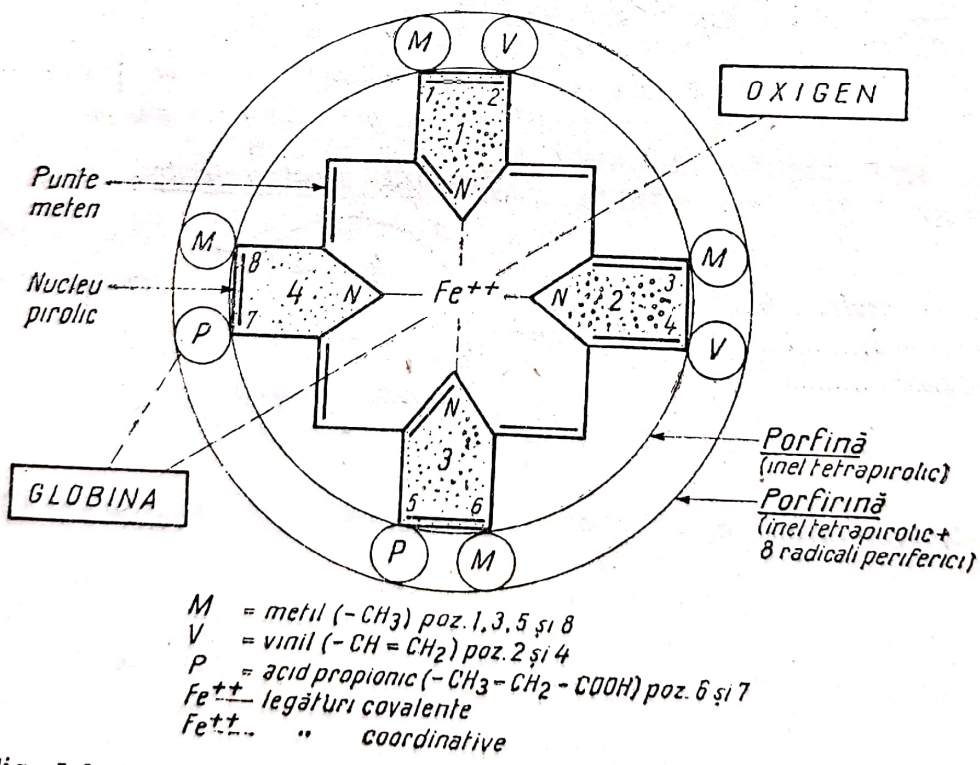


Fig. 5-2. Reprezentare schematică a structurii moleculei de uroporfirină.

O moleculă de porfirină este alcătuită din 4 inele pirolice, unite între ele prin 4 punți meten, care prezintă radiar 8 radicali laterali, iar în centru un atom de fier.

Acesta are, la periferia inelului tetrapirolic, 4 radicali de acid acetic și 4 radicali de acid propionic, care se succed într-o ordine anumită, în funcție de tipul de izomerie. Prin decarboxilarea acestor doi acizi (după modelul: $—CH_2—COOH \rightarrow CH_3 + CO_2$) iau naștere ceilalți doi derivați: coproporfirina și protoporfirina (fig. 5-3).

ANEXA

Radicalii celor 3 porfirine naturale sînt următorii:

4 rad. 4 rad.	$—CH_2—COOH$ $—CH_2—CH_2—COOH$	(ac. acetic) (ac. propionic)	**UROPORFIRINA** (cu 8 grupări —COOH)
4 rad. 4 rad.	$—CH_3$ $—CH_2—CH_2—COOH$	(metil) (acid propionic)	**COPROPORFIRINA** (dispar 4 grupări carboxil ale acidului acetic)
4 rad. 2 rad. 2 rad.	$—CH_3$ $—CH_2—CH_2—COOH$ $—CH=CH_2$	(metil) (ac. propionic) (vinil)	**PROTOPORFIRINA** (dispar din nou alte 2 grupări carboxil ale acidului propionic cu formarea a unor duble legături vinil)

a. **Uroporfirina.** Prima porfirină ce se obține prin biosinteză naturală, după condensarea precursorilor neporfirinici este uroporfirina — (în realitate uroporfirinogenul — vezi pag. 275). În funcție de alternanța radicalilor periferici de acid acetic și acid propionic putem avea 4 tipuri de uroporfirine (fig. 5-4). Uroporfirinele de tip 1 și 3 sînt naturale, iar cele de tip 2 și 4 sînt artificiale. Această caracteristică se menține, atît la porfirinele din regnul animal, cît și la cele din regnul vegetal. Existența în organismul tuturor viețuitoarelor a acestor doi izomeri a fost numită de Fischer *dualismul porfirinelor*. Tot Fischer a postulat că sinteza porfirinelor are un determinism genetic diferit pentru fiecare din cele două forme de izomerie, încît un izomer nu se poate transforma *în vivo* unul în celălalt. Sub formă liberă, izomerul I al uroporfirinei se găsește în mod normal la om în urină ca urme; în unele stări patologice — (porfirii) — poate apare în cantitate crescută în aproape toate organele. Această formă de izomerie nu este utilizabilă pentru sinteza hemului.

b. **Coproporfirina.** Comparată cu uroporfirina, coproporfirina (respectiv coproporfirinogenul) a înlocuit gruparea carboxil a acidului acetic cu un radical metil ($—CH_3$); rămîn astfel 4 grupări carboxil (cele ale acidului propionic). Coproporfirina are aceiași izomeri ca și uroporfirina. În stare liberă există ambii izomeri naturali ca urme în urină, fecale, eritrocite, precum și în diferite țesuturi din organism (măduvă, ficat etc.). Reacția de transformare a uroporfirinei în coproporfirină este catalizată de uroporfirinogen-decarboxilază.

Scanned with OKEN Scanner

c. **Protoporfirina** — (respectiv protoporfirinogenul) — este produsul final de sinteză naturală al porfirinelor, singura porfirină care poate încorpora fierul cu care, împreună, formează hemul; ceilalți produși pot fi considerați inactivi. Transformarea coproporfirinei în protoporfirină

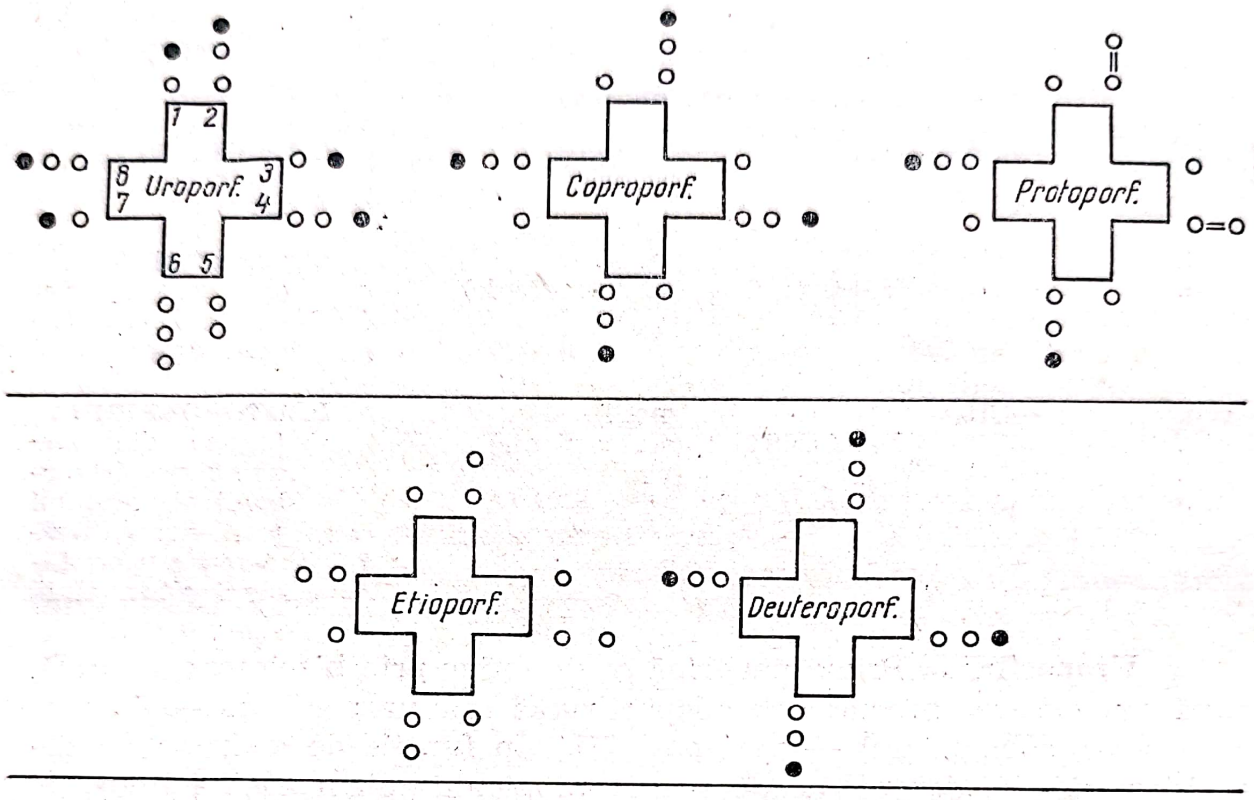


Fig. 5-3. Schemă simplificată a structurii chimice a porfirinelor naturale (uro-, copro- și protoporfirine, izomer 1) și a doi produși porfirinici sintetici: etio- și deuteroporfirina).

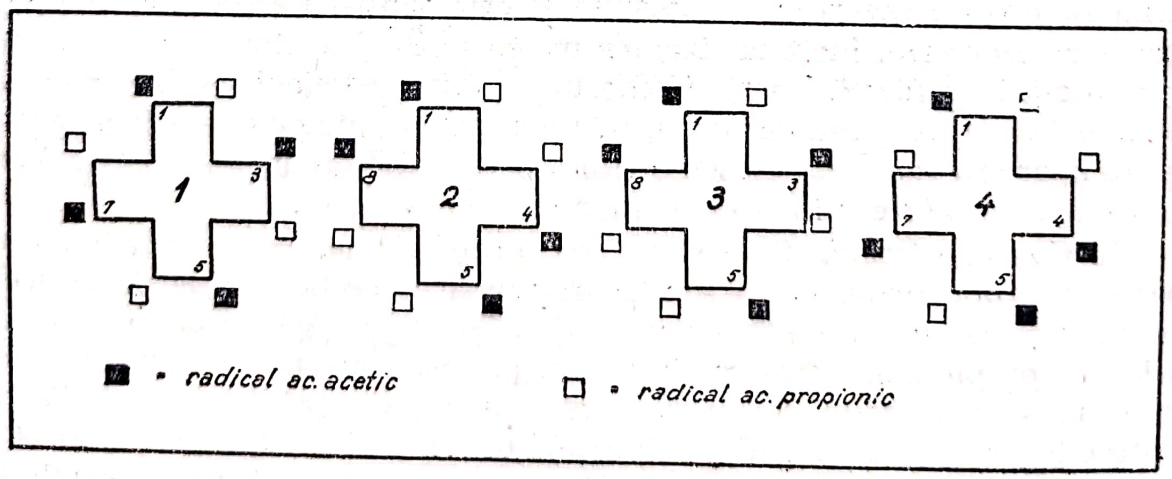
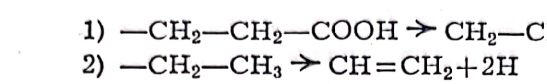


Fig. 5-4. Schemă simplificată a celor 4 izomeri ai porfirinelor (în figură — uroporfirina). Protoporfirina fiziologică este un izomer tip 3, Nr. 9.

comportă o dublă transformare: decarboxilarea a 2 din cei 4 acizi propionici și oxidarea în vinil a celor două funcții etilice rezultate:



1) $—CH_2—CH_2—COOH \rightarrow CH_2—CH_3 + CO_2$ și

2) $—CH_2—CH_3 \rightarrow CH=CH_2 + 2H$

Aceste etape au loc, spre deosebire de toate etapele anterioare, numai în prezența oxigenului. Oxidările sînt produse de o enzimă mitocondrială cu mare specificitate, copro-porfirinogen-oxidaza. Pentru protoporfirină (ca și pentru ceilalți precursori porfirinici) există 15 izomeri teoretic posibili, cel din hemoglobină fiind tipul III, subgrupa 9 (care este cel mai răspîndit) fiind constituentul de bază al tuturor cromoproteidelor tetrapirolice cu funcție respiratorie.

Nu se știe de ce în natură răspîndirea cea mai mare o au porfirinele de tipul III; acest tip a apărut în regnul animal sau vegetal cu milioane de ani în urmă, probabil pe cale mutațională și s-a menținut în această formă de-a lungul generațiilor și speciilor.

2. BIOSINTEZA PORFIRINELOR

Hemul este un constituent celular universal; sinteza lui are loc într-un număr mare de țesuturi, nu numai în organele hematopoietice. Anabolismul hemului depinde de biosinteza porfirinelor, pe cînd catabolismul lui este legat de formarea pigmenților biliari (vezi capitolul 7).

Deși, după structurile chimice descrise, formarea porfirinelor ar părea destul de simplă, în natură sinteza ei parcurge un ciclu complicat. Nucleii pirolici, punțile metenice și radicalii laterali nu se asamblează în molecula de porfirină ca atare, ci rezultă din combinarea unor substanțe, care cu greu mai pot fi recunoscute în etapele finale. Prin marcarea lor cu izotopi radioactivi s-a putut stabili modul în care celula sintetizează porfirinele, pornind de la substanțe simple, provenite din alimentație. Căile sintezei porfirinelor sînt aceleași, indiferent dacă este vorba de macro- sau microorganisme, din lumea animală sau vegetală. În primele două etape de sinteză a porfirinelor se realizează precursorii porfirinici, iar în următoarele, cele trei porfirine naturale.

a. **Prima etapă** a sintezei porfirinei constă în formarea unui acid cetonic linear cu 5 atomi de carbon: *acidul delta amino-levulinic* (AAL); el rezultă din condensarea a doi precursori: acidul succinic și glicocolul (glicina). Acest proces de sinteză se mai numește și ciclul lui Shemin sau formarea succinat-glicocolului (succinil-glicinei). „Materia primă" este de origine alimentară.

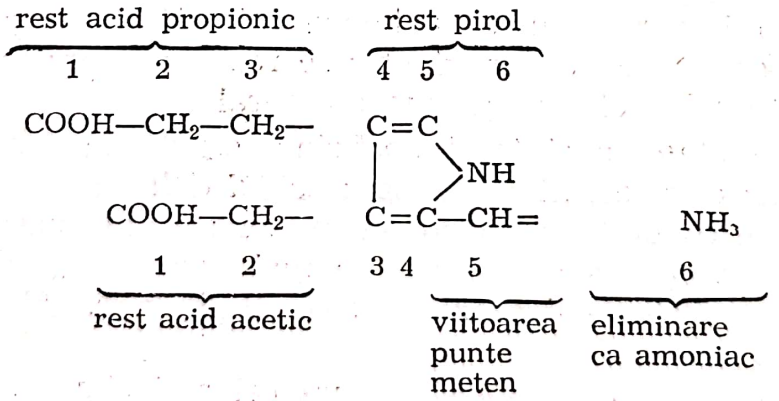
Glicocolul este acidul aminat cel mai simplu, format dintr-un radical metil, de care se leagă atît gruparea acidă cît și cea aminică ($NH_2—CH_2—COOH$). El nu poate fi înlocuit cu niciun alt acid aminat sau alt produs azotat; se găsește însă din abundență în toate țesuturile. La formarea moleculei de porfirină, glicocolul participă prin furnizarea azotului pirolic și a carbonului metilenic.

Scanned with OKEN Scanner

Acidul succinic este cel de al doilea precursor de bază al porfirinelor; el este un diacid ($COOH—CH_2—COOH$) care provine, în cea mai mare parte, din ciclul tricarboxilic (ciclul Krebs). El participă la formarea primului intermediar al porfirinei sub formă activată prin intermediul coenzimei A devenind succinil-coenzimă A. Energia necesară acestei reacţii este furnizată de ATP.

Din condensarea echimoleculară a celor doi constituenţi elementari (acid succinic şi glicocol, mediată de acetilcoenzima A), rezultă iniţial un produs intermediar cu o existenţă foarte scurtă, acidul α-amino β-cetoadipic, care însă nu poate fi izolat din cauza instabilităţii sale; acesta se decarboxilează rapid transformîndu-se în acid δ-amino-levulinic; formula lui este: $NH_2—CH_2—CO—CH_2—COOH$. Sinteza acestui precursor este catalizată de enzima acid-δ-amino-levulinic sintetaza, care limitează cantitativ biosinteza porfirinelor, avînd o mare importanţă fiziologică şi patologică. Prezenţa piridoxalfosfatului (vit. B_6), care este coenzima acestei reacţii, favorizează sinteza AAL. În afară de acesta, un anumit rol îl are şi tiamina (vit. B_1), acidul nicotinic (vit. PP), acidul lipoic etc. Această reacţie are loc intramitocondrial.

b. **A doua etapă** intermediară de formare a porfirinelor constă în condensarea a două molecule de AAL într-un derivat monopirolic numit *porfobilinogen* (PBG). Acest produs reprezintă 1/4 din molecula de uroporfirină, fiind format dintr-un inel pirolic, cu cei 2 radicali laterali (acid acetic şi acid propionic), precum şi dintr-o grupare meten (care devine ulterior punte de legătură între 2 piroli) (fig. 5-5). Aşezarea în vederea combinării celor două molecule lineare de AAL nu se face paralel (adică $C_1—C_1$, $C_2—C_2$ etc.), ci oblic (C_1 fără corespondent, apoi C_2 în dreptul lui C_1 etc., ultimul carbon din lanţul al doilea fiind, de asemenea, fără corespondent). Vezi formula de mai jos şi fig. 5-5.) Formula porfobilinogenului, primul produs cu structură pirolică de care sînt ataşaţi 2 radicali acizi periferici şi viitoarea punte meten este următoarea:



Reacţia este catalizată de către acid δ-amino-levulinic-dehidrogenază prin eliminarea a două molecule de apă. Activitatea enzimei se desfăşoară extramitocondrial, în faza lichidă a citoplasmei celulare.

c. **A treia etapă** de formare a porfirinelor este apariţia de cromogeni: uroporfirinogenul, coproporfirinogenul şi protoporfirinogenul.

Scanned with OKEN Scanner

Uroporfirinogenul este primul produs care realizează un nucleu tetrapirolic cu radicalii săi laterali. Acesta provine din condensarea simetrică a 4 molecule de PBG, cu eliminarea de 4 molecule de amoniac. Uroporfirinogenul conţine 6 atomi de hidrogen în plus faţă de uroporfirină şi, în general, faţă de porfirinele următoare (copro- şi protoporfirina) (fig. 5-6).

Condensarea este catalizată de două enzime: porfobilinogen-dezaminaza (uroporfirinogen sintetaza) şi porfobilinogen-izomeraza, care acţionează în faza apoasă a celulei (extramitocondrial).

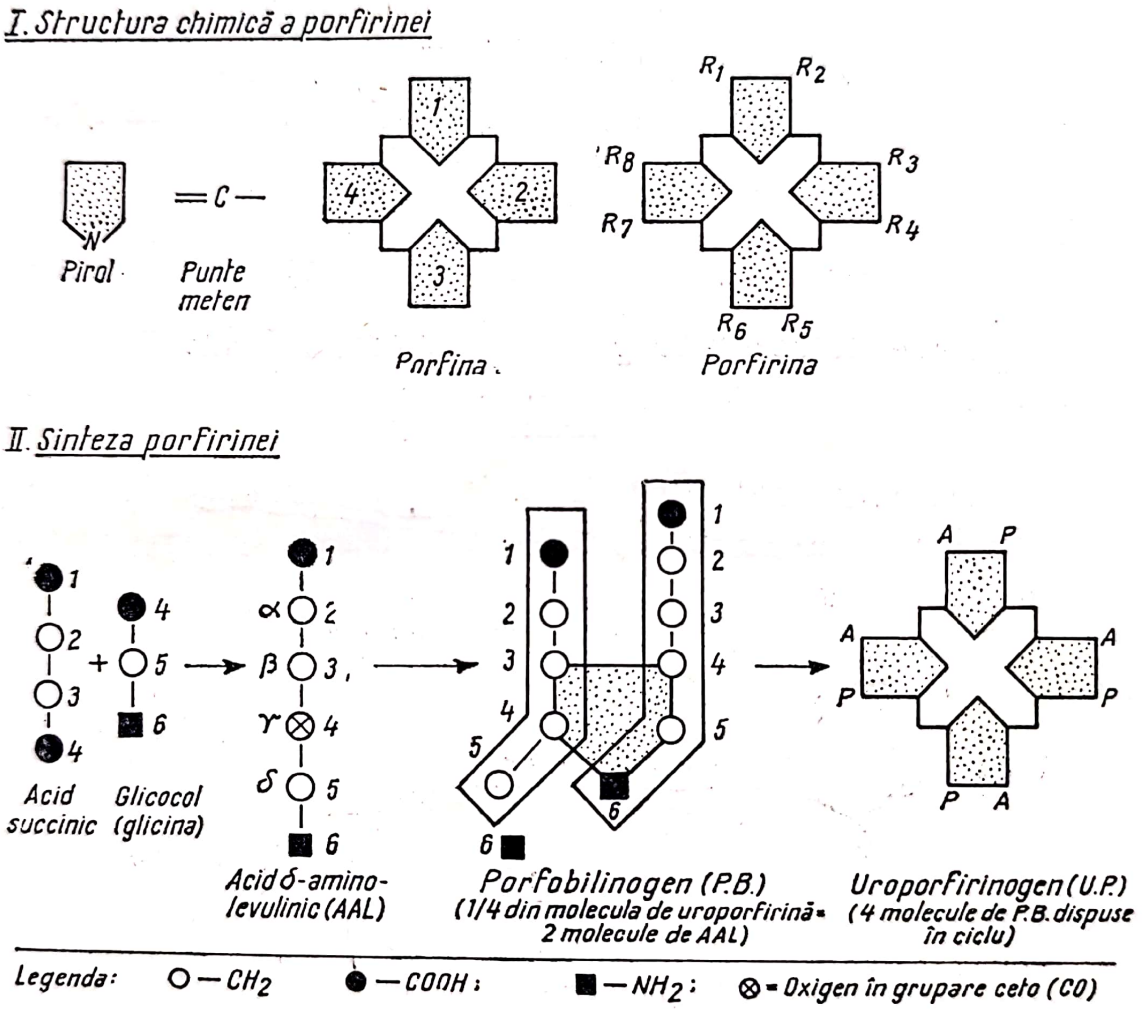


Fig. 5-5. Reprezentare simplificată a structurii chimice a unei porfirine (I) şi a primelor faze de sinteză a ei din cele două componente de bază: acidul succinic şi glicocolul, prin intermediul unui şir de procese enzimatice (II).

Coproporfirinogenul şi *protoporfirinogenul* au fost descrişi la pag. 271. În cursul biosintezei lor, uro- şi coproporfirinogenul nu se transformă în uro- şi coproporfirină, ci trec succesiv prin formele reduse (leucoderivaţi) amintite mai sus; porfobilinogenul este singurul care se transformă în produs oxidat colorat (protoporfirină). Apariţia intracelulară a unor cantităţi crescute de uroporfirină (care lipseşte în mod

normal) sau de copro- şi protoporfirină (care se găsesc în cantităţi mici) este patologică, iar constatarea lor stă la baza diagnosticului porfiriilor.

Biosinteza protoporfirinei se face intracelular prin intermediul enzimelor. După cum se remarcă din fig. 5-7, produşii intermediari parcurg un traseu citoplasmatic sinuos, cînd în afara, cînd în interiorul mitocon-

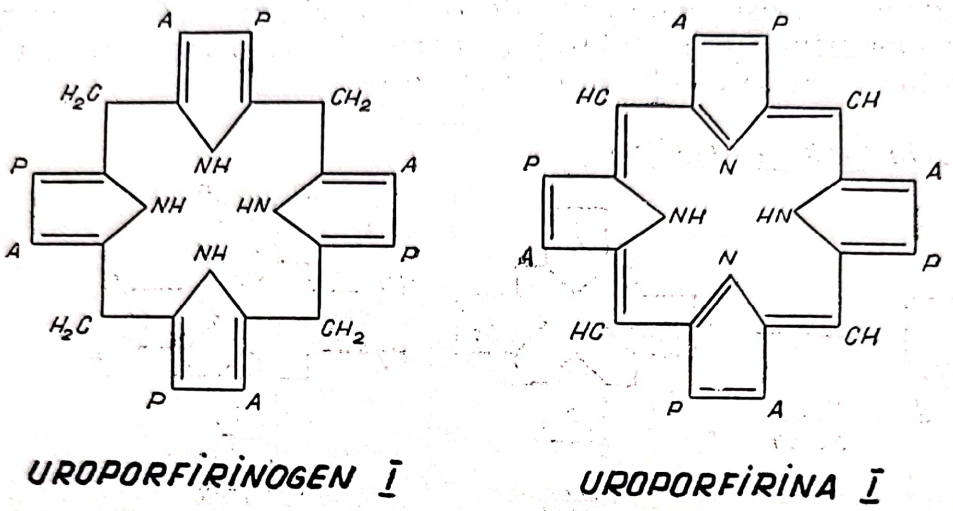


Fig. 5-6. Comparaţie între structura uroporfirinogenului şi a uroporfirinei.

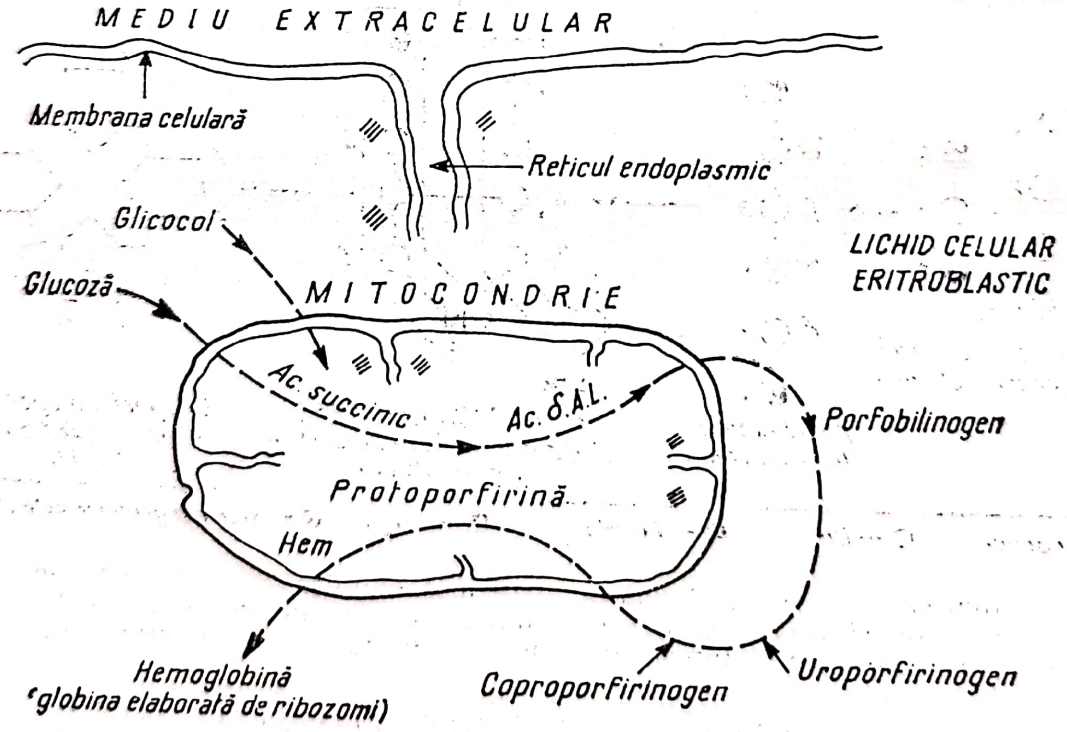


Fig. 5-7. Ilustrarea locului de formare a hemoglobinei în celulă.
Este reprezentat un fragment de citoplasmă cuprinzînd şi o mitocondrie. Porfirinele sînt sintetizate în celulele anumitor ţesuturi (măduvă osoasă, ficat etc.), pornind de la acidul succinic şi glicocol, parcurgînd o serie de reacţii enzimatice; enzimele interesate sînt localizate, atît în mitocondrii, cît şi în afara lor. De remarcat drumul sinuos (intra- şi extramitocondrial) al produşilor intermediari pînă la elaborarea produsului finit.

Scanned with OKEN Scanner

driilor. Este de reţinut şi alternanţa regulată a enzimelor sulfidice şi a celor nesulfidice (fig. 5-8). Reglarea cantitativă a activităţii acestor enzime este foarte precisă, dovadă faptul că faţă de protoporfirinele legate de globine, aflate în cantitate de 25—30 g, se găsesc maximum 5 mg de porfirine libere. Tulburarea simultaneităţii de sinteză a celor două componente ale moleculei de hemoglobină se întîlneşte în numeroase anomalii ca porfiriile, anemiile refractare etc.

Reglarea cantitativă a acestei biosinteze comportă mai multe mecanisme, numai parţial cunoscute. După majoritatea autorilor enzima limitativă a sintezei porfirinei este AAL-sintetaza, iar după alţii succinil-coenzima A; hemul în exces, chiar în cantităţi infime este, în calitate de produs final, factorul limitant al acestei enzime cu acţiune de corepresor (1)

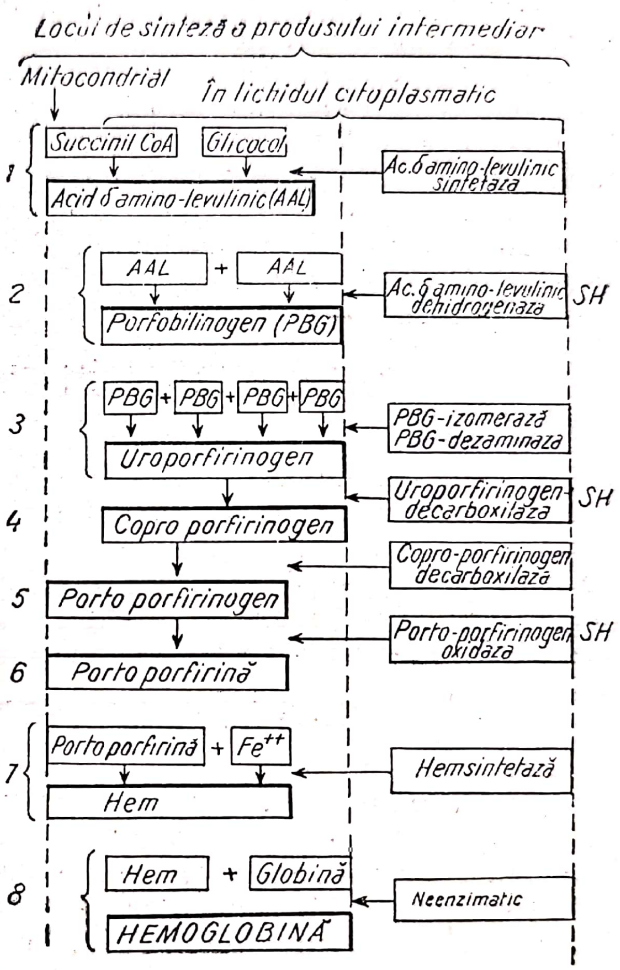


Fig. 5-8. Reprezentare schematică a sintezei hemoglobinei.

În stînga, produşii de sinteză; *în dreapta,* enzimele care intervin în diversele etape ale sintezei. SH=enzime sulfidice.

3. LEGĂTURA DINTRE PROTOPORFIRINĂ ŞI FIER

Fierul se găseşte în centrul careului tetrapirolic. Pentru a-şi îndeplini funcţia în complexul molecular hemoglobinic, fierul stabileşte 6 legături (variabile ca natură fizică şi forţă) cu unii din atomii învecinaţi. Din cele 6 legături ale fierului, 4 se fixează de atomii de azot pirolic ai protoporfirinei; din acestea 2 sînt legături covalente (puternice), care determină starea bivalentă a fierului, iar celelalte 2 sînt legături coordinative (mult mai slabe decît precedentele). Tot coordinative sînt şi celelalte 2 legături stabilite cu atomii de azot ai grupărilor imidazol din 2 molecule de histidină ale lanţului polipeptidic al globinelor. În felul acesta fierul este amplasat într-un centru bazic format din 4 atomi de azot — dispuşi în acelaşi plan; legăturile 5 şi 6 sînt situate pe un ax perpendicular. Cea de a 6-a legătură coordinativă nu se leagă direct cu atomul de azot al histidinei, ci prin intermediul unei molecule de O_2 pe care o captează din aerul

Scanned with OKEN Scanner

atmosferic; din această cauză această legătură este cea mai slabă din cele 4 legături coordinative, fapt care permite ca oxigenul captat să fie cedat cu ușurință țesuturilor cînd presiunea lui parțială în mediul respectiv scade sub anumite valori. Prezența celor două molecule de histidină în această poziție împiedică fierul să „rugineasca" în contactul cu O_2 (234, 243, 279) (fig. 5-2 și 5-12).

Trecerea fierului — aflat în citoplasma eritroblaștilor — din forma neheminică în forma heminică, este un proces dirijat enzimatic. Atașarea fierului la protoporfirină pentru a alcătui molecula de hem se face prin intermediul enzimei hemsintetaza și are loc intramitocondrial. Fierul în surplus (sesizabil histochimic) crește o dată cu maturația eritroblaștilor, stînjenind activitatea metabolică a acestora (118).

Ultima etapă a formării hemoglobinei este cuplarea hemului cu globina. În molecula de hemoglobină fierul este, fie feros, fie feric; în ambele stări el formează numeroși derivați cu un număr de liganzi (vezi fig. 5-2).

B. TULBURĂRI ÎN SINTEZA HEMULUI

Dintre cele două componente ale hemului: porfirina și fierul, ambele prezintă o patologie variată. Patologia sintezei protoporfirinei este dominată de sindromul porfirinic. Patologia încorporării fierului la molecula de protoporfirină este dominată de stările în care acest metal este deficitar în organism, deși nu sînt excepționale nici cazurile în care fierul se găsește în exces în organism, inclusiv în eritroblești fără ca acesta să poată fi încorporat pentru a realiza molecula de hem.

1. CLASIFICAREA ȘI PATOGENIA PORFIRIILOR

Porfiriile sînt stări dismetabolice ereditare sau dobîndite, caracterizate prin acumulări tisulare de porfirine neconjugate sau de precursori ale acestora, cu eliminări crescute de porfirine sau precursori prin urină, fecale, bilă și prin instalarea unor sindroame clinice.

Dacă împărțirea porfiriilor în ereditare și dobîndite nu ridică obiecții (în afara celei cutanate tardive, în care determinismul genetic nu este atît de evident), clasificarea porfiriilor ereditare, în eritropoietice și hepatice, este mai mult convențională decît patogenetică. Ea se bazează totuși pe faptul că atît eritroblaștii, cît și hepatocitele produc cantitățile cele mai mari de porfirine.

Clasificarea pe care o redăm are un schelet de bază propus de Günther (1911) și care a fost modificată ulterior de Waldenström (1957), Gajdos (1963) și alții.

I) *Porfirii ereditare*

A. *Porfirii eritropoietice*

1) Porfiria eritropoietică congenitală, boala Günther sau uroporfiria eritropoietică ereditară

2) Coproporfiria eritropoietică

3) Protoporfiria eritropoietică

B. *Porfirii hepatice*

Scanned with OKEN Scanner

1) Porfiria intermitentă acută
2) Porfiria cutanată tardivă
3) Porfiria mixtă (variegată)
4) Coproporfiria ereditară

II) *Porfirii secundare*

1) *Porfirii secundare toxicelor:* plumb, hexaclorbenzen etc.

2) *Porfirii secundare bolilor endogene:* boli infecţioase, hepatice (hepatite acute şi cronice, neoplasme hepatice), boli neurologice, avitaminoze etc.

Acumularea în organism a porfirinelor şi a precursorilor lor şi eliminarea lor prin produşii de excreţie este însoţită de o serie de semne clinice şi de laborator caracteristice pentru fiecare tip de porfirie. Deşi este interesată sinteza hemului, porfiriile, cu excepţia bolii Günther, nu afectează hematopoieza; nu se constată nici anemii sau poliglobulii, iar medulograma şi biopsia osoasă nu decelează nimic caracteristic, întrucît eritroblaştii nu suferă din cauza lipsei de protoporfirină.

Porfiriile fiind boli metabolice, în care este perturbată o etapă din sinteza unui produs finit, se produc acumulări ale unei substanţe intermediare în amonte de reacţia blocată. Indiferent de formă (ereditară sau dobîndită), în porfirii există un deficit în funcţia unei enzime la un anumit nivel al sintezei protoporfirinei. În porfiriile ereditare cauza este o mutaţie la nivelul genei structurale sau reglatoare care răspunde de sinteza enzimei respective, în timp ce în porfiriile cîştigate enzima (care se sintetizează cantitativ şi calitativ normal) este perturbată în funcţia ei de către o substanţă toxică (plumb, pesticide etc.). Chiar şi în porfiriile ereditare, anumite substanţe străine de organism (de exemplu barbituricele, fenilbutazona etc.) pot să se interfereze în funcţiile metabolice ale lanţului enzimatic, care pînă atunci a fost mai mult sau mai puţin compensat. Indiferent de mecanismul de instalare, se produce un asincronism în sinteza celor două componente ale hemoglobinei: cea porfirinică şi cea globinică.

În porfiriile ereditare mutaţia este înscrisă în codul genetic al fiecărei celule a organismului, indiferent de funcţia pe care o îndeplineşte. Celulele care sintetizează cea mai mare cantitate de molecule cu nucleu tetrapirolic sînt eritroblaştii şi hepatocitele, dar în afară de ele toate celulele secretă, pentru nevoile proprii, cantităţi mici de substanţe heminice cu rol în oxido-reducere. O parte din produşii metabolici în exces sînt vărsaţi în circulaţia generală de unde sînt eliminaţi prin urină, scaun, bilă etc. O altă parte (ce nu a putut fi excretată) se acumulează în toate celulele organismului, producîndu-se perturbări în funcţiile metabolice. Nu toate celulele au însă o toleranţă egală pentru aceşti produşi, unele celule ca neuronii, celulele cutanate etc. sînt cele mai sensibile. Ca şi în cazul acumulării de fier din hemocromatoză, în care perturbarea, deşi este difuză, duce la tulburări metabolice predilecte în anumite organe (insuficienţă cardiacă, diabet bronzat, ciroză pigmentară etc.), acumularea de produşi porfirinici duce, de asemenea, la anumite manifestări clinice selective.

Metaboliţii porfirinici produc două categorii principale de efecte nocive: demielinizarea şi fotodermatozele. Leziunile neuronului (demielinizare) sînt cele ce provoacă nu numai fenomenele neuro-psihice, ci şi pe cele abdominale (colici, constipaţie, vărsături etc.). Acumularea acestor compuşi în piele determină o descărcare de energie în contact cu lumina ultravioletă provocînd reacţii fotochimice care duc la distrugerea lizozomilor, cu eliberarea consecutivă de hidrolaze acide, răspunzătoare de leziunile cutanate (256, 341).

2. CLASIFICAREA ŞI PATOGENIA ANEMIILOR HIPOCROME

Constatarea unei hipocromii sugerează că fierul nu a putut fi încorporat în molecula de hem sau că hemul nu a putut fi încorporat în molecula de globină. Dozajul fierului seric ne va duce la constatarea că, în peste 90% din cazuri, nivelul fierului seric este scăzut sub 60 γ%.

Scanned with OKEN Scanner

a. **Clasificarea și patogenia anemiilor hipocrome hiposideremice** reprezintă circa 2/3 din totalul anemiilor întîlnite în practica medicală. Dintre acestea circa 9/10 sînt secundare hemoragiilor mici și repetate. În cadrul celor 10% sînt cuprinse anemiile hipocrome consecutive carențelor de fier alimentar, tulburărilor de absorbție digestivă, cele prin blocarea fierului în cazurile de boli inflamatorii (endocardită lentă, tbc., reumatism acut etc.) sau neoplasme, precum și cazurile de anemii hipocrome hiposideremice „primitive", ca cele din cloroză sau din anemiile achilice.

Spolierea sîngelui prin doze mici și repetate epuizează stocul de fier de rezervă, fierul seric scade, apare anemia în timp ce măduva caută să compenseze carența printr-o hiperproducție de eritroblești. La toate acestea se adaugă o hemoliză crescută la nivelul eritroblaștilor medulari (eritropoieză ineficace) cu un vîrf precoce a stercobilinogenului fecal (vezi fig. 7-36) precum și o protoporfirină eritrocitară liberă prin deficit de utilizare.

Deficitul de fier depășește sfera hemoglobinosintezei, avînd regercusiuni și asupra activității metabolice celulare prin perturbarea activității enzimelor heminice.

b. **Clasificarea și patogenia anemiilor refractare.** Sub denumirea de „anemie refractară la tratament" (cu fier, acid folic, vitamina B_{12} etc.) se înțelege un sindrom anemic heterogen cu etiologie multiplă, în care măduva osoasă este bogată în eritroblești, dar aceștia rămîn tineri, măduva nefiind productivă. Tulburarea sintezei hemului poate avea loc la diferite nivele, începînd cu primele faze de precursori porfirinici (fuziunea acidului succinic cu glicocolul), pînă la ultimul stadiu, acela al combinării fierului cu protoporfirina (99, 147, 221).

Dintre cauzele care duc la aceste tulburări, unele sînt cunoscute, ca unele boli ereditare (talasemie), intoxicații (Pb), sensibilizări la medicamente (izoniazidă, cicloserină, alte tuberculostatice), colagenoze (poliarterita nodoasă, artrita reumatoidă), boli neoplazice (carcinom, leucemii, mielofibroză, mielom), sindrom de malabsorbție, anemie pernicioasă, anemii hemolitice intra- și extraeritrocitare, alcoolism cronic etc. Dintre cauzele primitive de anemie eritroblastică există mai multe particularități patogenice a căror substrat răspunzător de defecțiunile biochimice rămîne, în cea mai mare parte, necunoscut. Tulburarea pare să fie dată de existența unor anomalii enzimatice la nivelul populației celulelor cap de serie roșie. Indiferent de nivelul de sinteză a hemului, caracterul ineficace a acestei eritropoieze este dat, în final, de tulburarea încorporării fierului în eritrocite (anemie sideroacrestică). De aceea un număr important de eritroblești tineri devin neviabili, suferind o liză precoce intramedulară.

Sub aspect clinic, hipocromia contrastează cu hipersideremia și cu un exces de fier neheminic în eritroblești. Din această cauză porfirinele eritrocitare apar și ele crescute în diferite stadii de sinteză, în funcție de tipul de anemie refractară. În varianta piridoxino-sensibilă blocajul sintezei hemului se situează în faza inițială; din tabloul anemiilor cu hipersideroblești, această variantă este una din formele mai rar întîlnite în practică. Anemia sideroacrestică ereditară II Heilmeyer este o tulburare cu localizare la nivelul trecerii acidului α-amino-β-cetoadipic în acid δ-aminolevulinic, iar anemia sideroacrestică ereditară I Heilmeyer (legată de sex) este o tulburare cu localizare la nivelul trecerii coproporfirinei în protoporfi-

Scanned with OKEN Scanner

rină. La nivelul unirii fierului cu protoporfirina s-au descris mai multe entităţi morbide, unele primitive (anemia sideroblastică idiopatică — Björkmann) şi altele secundare (intoxicaţia cu Pb, talasemia, infecţii etc.).

De menţionat observaţiile că în stadiile finale, anemiile eritroblastice primitive se transformă — într-un număr important de cazuri — în leucemii ceea ce a determinat pe unii autori să le numească „stări preleucemice".

C. TEHNICI DE LABORATOR UTILIZATE ÎN PATOLOGIA HEMULUI

1. TEHNICI DE DIAGNOSTIC AL PORFIRINELOR ŞI AL PRECURSORILOR PORFIRINICI

a. **Examenul macroscopic al urinii.** Certitudinea diagnosticului în aceste anomalii ne-o dă dozarea substanţelor porfirinice în diferiţi produşi de excreţie, dar pînă la obţinerea acestor rezultate, care nu sînt la îndemîna oricărui laborator, nu va fi neglijat examenul macroscopic al urinii; aceasta permite uneori o orientare preţioasă în cazurile cu caracter de urgenţă sau cînd examenele de laborator nu se pot face în timp util. Urina emisă are o culoare roşie „Porto". Este de reţinut că atît precursorii porfirinici, cît şi produşii porfirinici intermediari reduşi (uro-, copro- şi protoporfirinogenii) sînt incolori, de aceea urina poate avea uneori o culoare normală la emisie. Corpii porfirinici reduşi se oxidează, în general, în cursul stazei în vezica urinară sau la un timp după emisie, în uro-, copro- sau protoporfirină. Pentru a grăbi această oxidare se poate acidifia urina, în cazul cînd aceasta ar fi alcalină.

b. **Teste biochimice**

1) *Dozarea urinară a porfirinelor şi a precursorilor porfirinici.* O atenţie deosebită trebuie acordată modului de recoltare a urinii; urina din 24 de ore trebuie colectată într-un recipient de culoare închisă, învelit suplimentar într-o hîrtie neagră; va fi păstrată la rece (iarna, afară), iar în anotimpurile călduroase se vor introduce în recipient 2—3 ml de toluol pentru a împiedica fermentaţia.

Cercetarea porfobilinogenului se bazează pe proprietatea acestui corp monopirolic de a da o coloraţie roşie în mediu clorhidric cu reactivul Ehrlich (para-dimetil-aminobenzaldehid). O reacţie pozitivă presupune existenţa unei cantităţi mai mari de 2 mg/l, necesitînd dozarea.

După tehnica lui Mauzerall şi Granick, dozarea PBC şi a AAL se bazează pe trecerea urinii prin suspensie de răşini schimbătoare de ioni: Dowex 2, apoi Dowex 50, PBG fiind absorbit specific pe prima, iar AAL pe cea de-a doua. După eluţie PBG se dozează colorimetric pe baza culorii ce o primeşte în contact cu reactivul Ehrlich în mediu acetic şi percloric, în timp ce AAL este transformat întîi în compus monopirolic de către acetil-acetona la cald şi în mediu acid, apoi se dozează în acelaşi fel ca şi PPG (256).

Scanned with OKEN Scanner

Porfirinele se dozează spectrofotometric pe eluat clorhidric, la 402 nm pentru coproporfirine și la 405 nm, pentru uroporfirine.

Separarea formelor I și III ale uro- și coproporfirinelor se face cromatografic cu esteri metilici (formați prin acțiunea alcoolului metilic în mediu sulfuric); identificarea se face prin studierea cristalelor și prin determinarea punctului lor de fuziune (256).

2) *Dozarea porfirinelor în materiile fecale* se efectuează după un principiu identic cu cel urinar. Se extrag întîi porfirinele; complexul copro- plus proporfirinic se separă de uroporfirinele care s-ar găsi asociate, prin pasaj în mediu eterat. Coproporfirina se dizolvă în HCl 0,1 N iar protoporfirina în HCl 2 N. Dozarea se face spectrofotometric în lumină U.V. (176).

3) *Protoporfirina eritrocitară.* În condiții normale protoporfirina liberă în eritrocit se găsește în proporție mai mică de o moleculă la 20 000 molecule de hem. Valoarea medie normală este de circa 40 μg la 100 ml eritrocite (±15 μg). Se consideră crescute valorile care depășesc 70 μg%. Valorile cele mai ridicate apar în anemiile prin deficit de fier în care media este de circa 200 μg%. De asemenea, există o corelație inversă între saturația transferinei plasmatice cu fier și protoporfirina eritrocitară; cînd aceasta scade sub 15%, concentrația protoporfirinei este mai ridicată, producția medulară fiind limitată din cauza scăderii ofertei de fier. Creșteri ale protoporfirinei eritrocitare mai pot fi găsite și în protoporfiria eritropoietică, în intoxicațiile cu plumb, precum și în infecții, în anemiile hemolitice și, mai puțin, în anemiile sideroblastice. În anemiile feriprive acest test reprezintă un element important pentru diagnostic. Prin tehnica simplificată de Heller și colab. această determinare a cunoscut o mare extindere (176).

c. **Teste fizice. Urmărirea corpilor porfirinici la lumina ultravioletă.** Materialele recoltate de la acești bolnavi (urină, fecale, frotiuri de sînge, fragmente de biopsie osoasă etc.) dau o fluorescență roșie-portocalie la lumina Wood. Pe frotiul de măduvă osoasă eritrocitele și eritroblaștii prezintă o lumină roșie persistentă (fluorocite și fluoroblești); uneori se poate constata în interiorul lor prezența de cristale de porfirină. Pe piesele de biopsie osoasă se pot distinge depuneri de porfirine localizate în anumite zone. Fluorescența fragmentelor de oase este permanentă și nu poate fi înlăturată cu apă, alcool sau formol. Osul conservat la o temperatură de —32°C nu-și pierde fluorescența porfirinică nici după un an.

2. TEHNICI DE DIAGNOSTIC AL ANEMIILOR HIPOCROME

Anemiile hipocrome sînt, în general, simplu de diagnosticat în formele avansate de boală, atît cele hipo-, cît și cele hipersideremice.

a. **Semne de laborator în anemiile hipocrome hiposideremice**

1) *Examenul morfologic al sîngelui periferic.* Scăderea hemoglobinei eritrocitare face ca eritrocitele să aibă un dia-

Scanned with OKEN Scanner

metru redus (microcitoză), să fie mai subțiri (leptocitoză) și mai palide (hipocromie, anulocitoză). Volumul eritrocitar mediu (VEM) indică valori sub 70 μ^3 (normal peste 90 μ^3).

2) *Scăderea hemoglobinei circulante,* pusă în evidență pe baza unor constante eritrocitare directe evidențiază o încărcare de hemoglobină pe eritrocit (HEM) sub 25 $\gamma\gamma$. Concentrația eritrocitară medie cu hemoglobină (CHEM) este cu mult sub 30%.

3) *Scăderea nivelului fierului seric.* Sideremia evidențiază valori sub 70 µg%; în cazuri extreme pînă la 10 µg%. Capacitatea totală de fixare a siderofilinei este crescută (400—500 µg% sau și mai mare.

4) *Mielograma* arată o măduvă legată cu hiperplazie a eritroblaștilor (anemie de tip regenerativ) însă cu o scădere pronunțată a sideroblaștilor medulari la 2—3% (față de 20—50% în mod normal).

5) *Fierul de depozit* din măduvă, ficat, splină evidențiază o scădere extremă a fierului de depozit.

6) *Cinetica fierului* arată o accelerare a turnover-ului fierului plasmatic la circa 30 de minute (față de 90—180 de minute); încorporarea fierului în eritrocite este de 100% după numai 3—4 zile (față de 80% după 7—10 zile).

7) *Porfirinele libere* din eritrocit arată valori foarte crescute de protoporfirină (500—1 000 µg% față de 20—50 µg% în mod normal).

b. Semne de laborator în anemiile hipocrome hipersideremice

1) *Exemenul morfologic* al sîngelui periferic și *scăderea hemoglobinei circulante* se aseamănă mult cu situația din anemiile hipocrome, hiposideremice; în formele hipersideremice există însă un dismorfism eritrocitar (normo- și hipocromic pe același frotiu de sînge periferic).

2) *Creșterea nivelului fierului seric.* Sideremia se ridică la valori ce depășesc adesea 150 µg%; capacitatea totală de fixare a siderofilinei este în general mai scăzută decît normal (200—250 µg%).

3) *Mielograma* evidențiază o măduvă foarte bogată, cu inversarea raportului granulocite/eritroblești și cu indicele de maturare mult deviat la stînga (măduvă albastră). Morfologic, eritroblaștii au și ei o citoplasmă crenelată (eritroblești „zdrențuiți"), iar colorația Perls evidențiază un exces de granulații de feritină în jurul nucleului (sideroblești „în coroană") într-o proporție de 50—95% din eritroblești.

4) *Fierul de depozit* din măduvă, ficat, splină, evidențiază un exces de feritină și hemosiderină în celulele reticulare.

5) *Cinetica fierului* arată un turnover al fierului crescut alături de o scădere și o lentoare a încorporării fierului în eritrocite.

6) *Porfirinele libere* eritrocitare arată valori mai crescute de protoporfirină (60—300 µg%), fără să atingă valorile din anemia feriprivă.

Scanned with OKEN Scanner

II. COMPONENTA PROTEICĂ A HEMOGLOBINEI: GLOBINA

A. STRUCTURA CHIMICĂ ŞI EVOLUŢIA ONTOGENETICĂ A GLOBINELOR UMANE

Molecula de hemoglobină este un tetramer alcătuit din 4 subunităţi numite catene sau lanţuri polipeptidice, identice două cîte două, cuplate fiecare cu cîte o moleculă de hem. În ansamblu molecula de hemoglobină

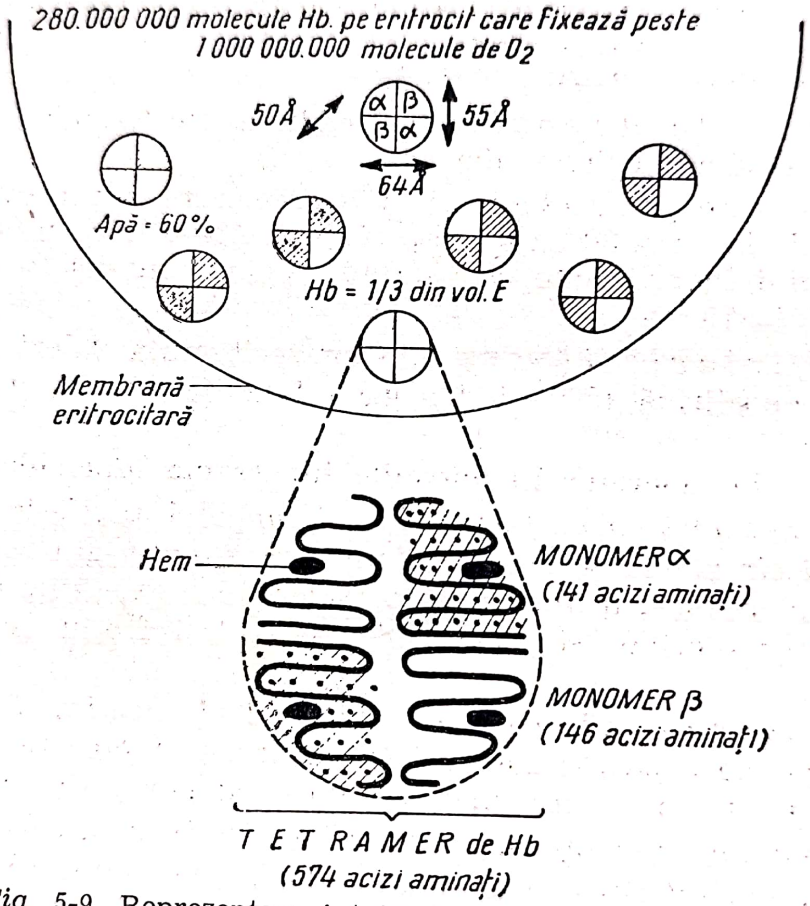


Fig. 5-9. Reprezentare intuitivă a sferoidului de hemoglobină.

În precursorii eritrocitari aparatul genetic al speciei respective sintetizează sute de milioane de molecule de Hb, grupate în mici „sferule" unde li se asigură primenirea faţă de agenţii oxidanţi.

În partea de jos a figurii este redat (la scară mai mare) tetramerul de Hb cu cele două perechi de monomeri; în una din meandrele periferice ale fiecărui monomer îşi are sediul cîte o moleculă de hem.

are aspectul unui sferoid cu dimensiuni de 64×55×40 Å. Un eritrocit conţine circa 280 de milioane de astfel de molecule dispersate în lichidul intraeritrocitar; volumul lor ocupă circa 1/3 din greutatea eritrocitului (fig. 5-9) (28, 56, 99, 143, 151, 234).

Scanned with OKEN Scanner

Indiferent de varietatea ontogenetică sau filogenetică a hemoglobinei, hemul este totdeauna invariabil, individualitatea moleculei fiind imprimată de componenta proteică. Aceste deosebiri sînt cu atît mai importante, cu cît speciile sînt mai îndepărtate.

La vertebratele superioare cele 4 molecule de hem ocupă un loc bine definit în cîte o buclă a lanţurilor globinice respective, aproape de suprafaţa complexului molecular. Hemul, fără asocierea cu globina, ar duce la formarea de legături ireversibile cu O_2.

Compoziţia chimică şi structura moleculei de hemoglobină au putut fi determinate astăzi graţie eforturilor unor cercetători din domenii diferite (fizicieni, chimişti, biologi, medici) (35, 115, 272).

1. STRUCTURA CHIMICĂ A MOLECULELOR DE GLOBINĂ

Ca pentru orice proteină, pentru componenta proteică a hemoglobinei se descriu patru nivele structurale. (Vezi şi cap. 1, pag. 44) 36, 117, 118, 143, 272).

Structura primară este reprezentată de secvenţa acizilor aminaţi, totdeauna identică pentru acelaşi tip de lanţ globinic, determinată genetic. Tetramerul de hemoglobină conţine 574 de acizi aminaţi: cele 2 lanţuri α conţin fiecare cîte 141 de acizi aminaţi, iar lanţurile β cîte 146. Acelaşi număr de acizi aminaţi, ca şi lanţurile β, îl au şi lanţurile γ, δ şi ε, care sînt variante ale acestuia (lanţuri non α) (tabelul 5-1). Astăzi se cunoaşte rolul diferiţilor acizi aminaţi în determinarea unor proprietăţi funcţionale ale Hb. Toţi cei 20 de acizi aminaţi care alcătuiesc proteinele regnului animal şi vegetal iau parte la alcătuirea hemoglobinelor umane. Izoleucina, care nu este întîlnită în catenele adultului, este prezentă în lanţul γ al hemoglobinei fetale. Repartizarea lor în lanţurile polipeptidice este inegală, după cum se vede şi din fig. 5-10.

Structura secundară a lanţului globinic se prezintă fie linear (sau uşor ondulat), fie prin răsucirea (spiralarea) unor segmente ale lanţului polipeptidic în jurul unui ax imaginar, interesînd, pentru molecula de Hb, circa 70% din lungimea acestuia. Canalul creat în centrul tubului spiralat este prea îngust pentru a permite pătrunderea apei în interior, ceea ce conferă moleculei un plus de stabilitate.

Structura terţiară a hemoglobinei, ca şi a oricărei molecule proteice, reprezintă o configuraţie spaţială caracteristică ce rezultă din secvenţa particulară a acizilor aminaţi, bazată pe forţele de atracţie sau repulsie dintre radicalii polari ai acestora. În cazul hemoglobinei se formează 8 segmente helicoidale, notate de la capătul N terminal, cu majuscule de la A la H, şi 7 segmente nehelicoidale intermediare, numite „bucle" sau „coturi", notate bimajuscular (AB, BC etc.) (fig. 5-11).

La fiecare cot al lanţului polipeptidic este prezentă şi prolina. Ea are o structură chimică diferită de a celorlalţi acizi aminaţi (vezi fig. 1-20), ceea ce o face incapabilă de a contracta legături de hidrogen. Prezenţa ei permite elasticitatea necesară de încovoiere a lanţului polipeptidic. În afară de prolină, pentru formarea zonelor nehelicoidale, mai sînt necesare histidina, acidul glutamic şi acidul aspartic. Cu toate că printre factorii care menţin lanţurile peptidice în poziţie în-

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 5-1

Secvența aminoacizilor în lanțurile α, β și γ ale hemoglobinei umane. (După datele lui Braunitzez Rudolff, 1962; Schroeder și colab., 1962; precum și Lehmann și Huntsman, 1966). Zonele punctate dintre literele majuscule (ex. A----A) indică segmentele cu structură helicoidală ale lanțurilor polipeptidice, iar zonele nepunctate (ex. A B) indică structura nehelicoidală a acestora.

```
                                A ..........................................................
α-Val-     Leu-Ser-Pro-Ala-Asp-Lys-Thr-Asn-Val-Lys-Ala-Ala-Try-Gly-Lys-Val-
  1         2   3   4   5   6   7   8   9  10  11  12  13  14  15  16  17
β-Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Lys-Ser-Ala-Val-Thr-Ala-Leu-Try-Gly-Lys-Val-
  1   2   3   4   5   6   7   8   9  10  11  12  13  14  15  16  17  18
γ-Gly-His-Phe-Thr-Glu-Glu-Asp-Lys-Ala-Thr-Ilm-Thr-Ser-Leu-Try-Gly-Lys-Val-
  1   2   3   4   5   6   7   8   9  10  11  12  13  14  15  16  17  18
                                A ..........................................................

.....A                          B ..........................................................B
α-Gly-Ala-His-Ala-Gly-Glu-Tyr-Gly-Ala-Glu-Ala-Leu-Glu-Arg-Met-Phe-Leu-Ser-Phe-
  18  19  20  21  22  23  24  25  26  27  28  29  30  31  32  33  34  35  36
β-Asn-      Val-Asp-Glu-Val-Gly-Gly-Glu-Ala-Leu-Gly-Arg-Leu-Leu-Val-Val-Tyr-
  19        20  21  22  23  24  25  26  27  28  29  30  31  32  33  34  35
γ-Asn-      Val-Glu-Asp-Ala-Gly-Gly-Glu-Thr-Leu-Gly-Arg-Leu-Leu-Val-Val-Tyr-
  19        20  21  22  23  24  25  26  27  28  29  30  31  32  33  34  35
.....A                          B ..........................................................B

        C ..........................C                          D ..........
α-Pro-Thr-Thr-Lys-Thr-Tyr-Phe-Pro-His-Phe-     Asp-Leu-Ser-His-
  37  38  39  40  41  42  43  44  45  46        47  48  49  50
β-Pro-Try-Thr-Glu-Arg-Phe-Phe-Glu-Ser-Phe-Gly-Asp-Leu-Ser-Thr-Pro-Asp-Ala-Val-
  36  37  38  39  40  41  42  43  44  45  46  47  48  49  50  51  52  53  54
γ-Pro-Try-Thr-Glu-Arg-Phe-Phe-Asp-Ser-Phe-Gly-Asn-Leu-Ser-Ser-Ala-Ser-Ala-Ileu-
  36  37  38  39  40  41  42  43  44  45  46  47  48  49  50  51  52  53  54
        C ..........................C                          D ..........

---------D                E ----------------------------------------------------------
α-      Gly-Ser-Ala-Glu-Val-Lys-Gly-His-Gly-Lys-Lys-Val-Ala-Asp-Ala-Leu-Thr-Asn-
        51  52  53  54  55  56  57  58  59  60  61  62  63  64  65  66  67  68
β-Met-Gly-Asn-Pro-Lys-Val-Lys-Ala-His-Gly-Lys-Lys-Val-Leu-Gly- Ala-Phe-Ser-Asp-
  55  56  57  58  59  60  61  62  63  64  65  66  67  68  69  70  71  72  73
γ-Met-Gly-Asn-Pro-Lys-Val-Lys-Ala-His-Gly-Lys-Lys-Val-Leu-Thr-Ser-Leu-Gly-Asp-
  55  56  57  58  59  60  61  62  63  64  65  66  67  68  69  70  71  72  73
---------D                E ----------------------------------------------------------
```

Scanned with OKEN Scanner

```
----------------------E                    F ----------------------------------------------
α     -Ala-Val-Ala-His-Val-Asp-Asp-Met-Pro-Asn-Ala-Leu-Ser-Ala-Leu-Ser-Asp-Leu-His-
        65  70  71  72  73  74  75  76  77  78  79  80  81  82  83  84  85  86  87
β     -Gly-Leu-Ala-His-Leu-Asp-Asn-Leu-Lys-Gly-Thr-Phe-Ala-Thr-Leu-Ser-Glu-Leu-His-
        74  75  76  77  78  79  80  81  82  83  84  85  86  87  88  89  90  91  92
γ     -Ala-Ileu-Lys-His-Leu-Asp-Asp-Leu-Lys-Gly-Thr-Phe-Ala-Glu-Leu-Ser-Glu-Leu-His-
        74  75  76  77  78  79  80  81  82  83  84  85  86  87  88  89  90  91  92

----------------------E                    F ----------------------------------------------

-------F                    G ------------------------------------------------------------------------------------
α-Ala-His-Lys-Leu-Arg-Val-Asp-Pro-Val-Asn-Phe-Lys-Leu-Leu-Ser-His-Cys-Leu-Leu-Val-Thr-Leu-
  88  89  90  91  92  93  94  95  96  97  98  99  100 101 102 103 104 105 106 107 108 109
β-Cys-Asp-Lys-Leu-His-Val-Asp-Pro-Glu-Asn-Phe-Arg-Leu-Leu-Gly-Asn-Val-Leu-Val-Cys-Val-Leu-
  93  94  95  96  97  98  99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114
γ-Cys-Asp-Lys-Leu-His-Val-Asp-Pro-Glu-Asn-Phe-Lys-Leu-Leu-Gly-Asn-Val-Leu-Val-Thr-Val-Leu-
  93  94  95  96  97  98  99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114
-------F                    G ------------------------------------------------------------------------------------

----------G                    H ----------------------------------------------------------
α-Ala-Ala-His-Leu-Pro-Ala-Glu-Phe-Thr-Pro-Ala-Val-His-Ala-Ser-Leu-Asp-Lys-Phe-Leu-
  110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129
β-Ala-His-His-Phe-Gly-Lys-Glu-Phe-Thr-Pro-Pro-Val-Glu-Ala-Ala-Tyr-Glu-Lys-Val-Val-
  115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134
γ-Ala-Ileu-His-Phe-Gly-Lys-Glu-Phe-Thr-Pro-Glu-Val-Glu-Ala-Ser-Try-Glu-Lys-Met-Val-
  115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134

----------G                    H ----------------------------------------------------------

-------------------------------------------------------------H
α-Ala-Ser-Val-Ser-Thr-Val-Leu-Thr-Ser-Lys-Tyr-Arg
  130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141
β-Ala-Gly-Val-Ala-Asn-Ala-Leu-Ala-His-Lys-Tyr-His
  135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146
γ-Thr-Gly-Val-Ala-Ser-Ala-Leu-Ser-Ser-Arg-Tyr-His
  135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146

------------------------------------------------------------ H
```


Scanned with OKEN Scanner

covoiată se numără și legăturile disulfidice (—S—S—), acestea nu sînt obligatorii pentru formarea unei configurații terțiare stabile; hemoglobina și mioglobina nu conțin astfel de legături covalente în structura lor terțiară.

În lanțul polipeptidic există 33 de resturi de acizi aminați nepolari, dispuse într-o anumită secvență. Acestea sînt cele mai rigide și imprimă lanțului o struc-

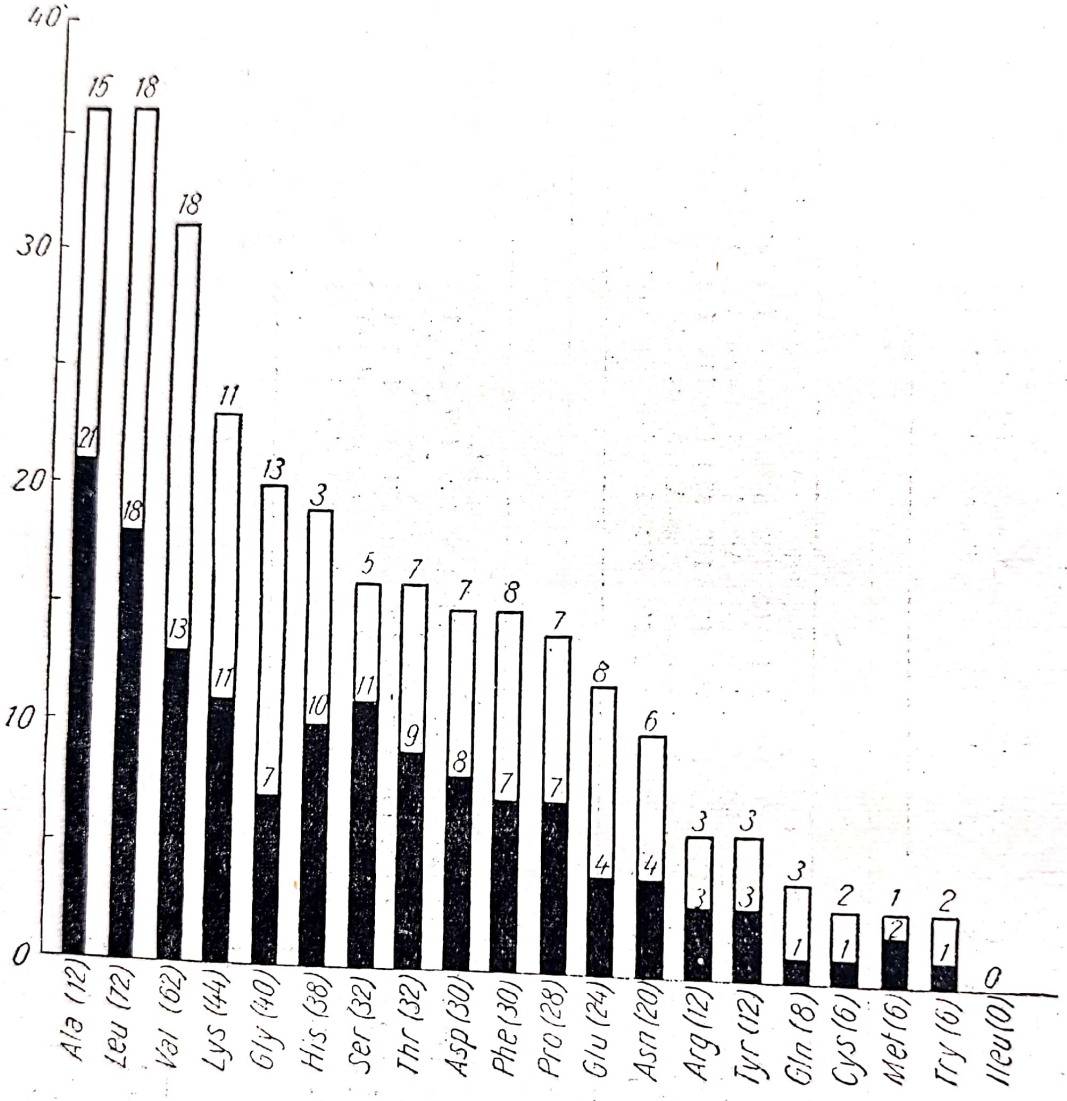


Fig. 5-10. Conținutul în acizi aminați al lanțurilor α (în alb) și al lanțurilor β (în negru).

Din cei 20 de acizi aminați, din care sînt alcătuite proteinele viețuitoarelor, singură izoleucina lipsește din cele două lanțuri de hemoglobină majoră a adultului; ea se găsește în schimb în hemoglobina fetală. Cifrele deasupra coloanelor indică de cîte ori apare acidul aminat în lanțurile α sau β. Cifrele de pe abscisă (în paranteză) arată de cîte ori apare acidul aminat în cei 574 acizi aminați ai tetramerului de globină. Cel mai frecvent apare alanina și leucina (de 72 de ori, respectiv 12,5%); cel mai rar apare cisteina, metionina și triptofanul (de cîte 6 ori, respectiv 1%).

tură helicoidală, dar în același timp asigură moleculei și o mai bună stabilitate, constituind „osatura" moleculei. Spre deosebire de acești acizi aminați nepolari care „se înfundă" în zonele interioare ale moleculei, ceilalți peste 100 de acizi aminați sînt localizați la suprafață, stabilind contacte cu apa sau cu alte molecule din mediul ambiant.

Structura cuaternară a hemoglobinei rezultă din interacţiunea celor două perechi de lanţuri. Tetramerul de hemoglobină formează o moleculă unitară, care nu se disociază în soluţie. Contactul dintre subunităţile identice (omologe) se face printr-un număr redus de acizi ami-

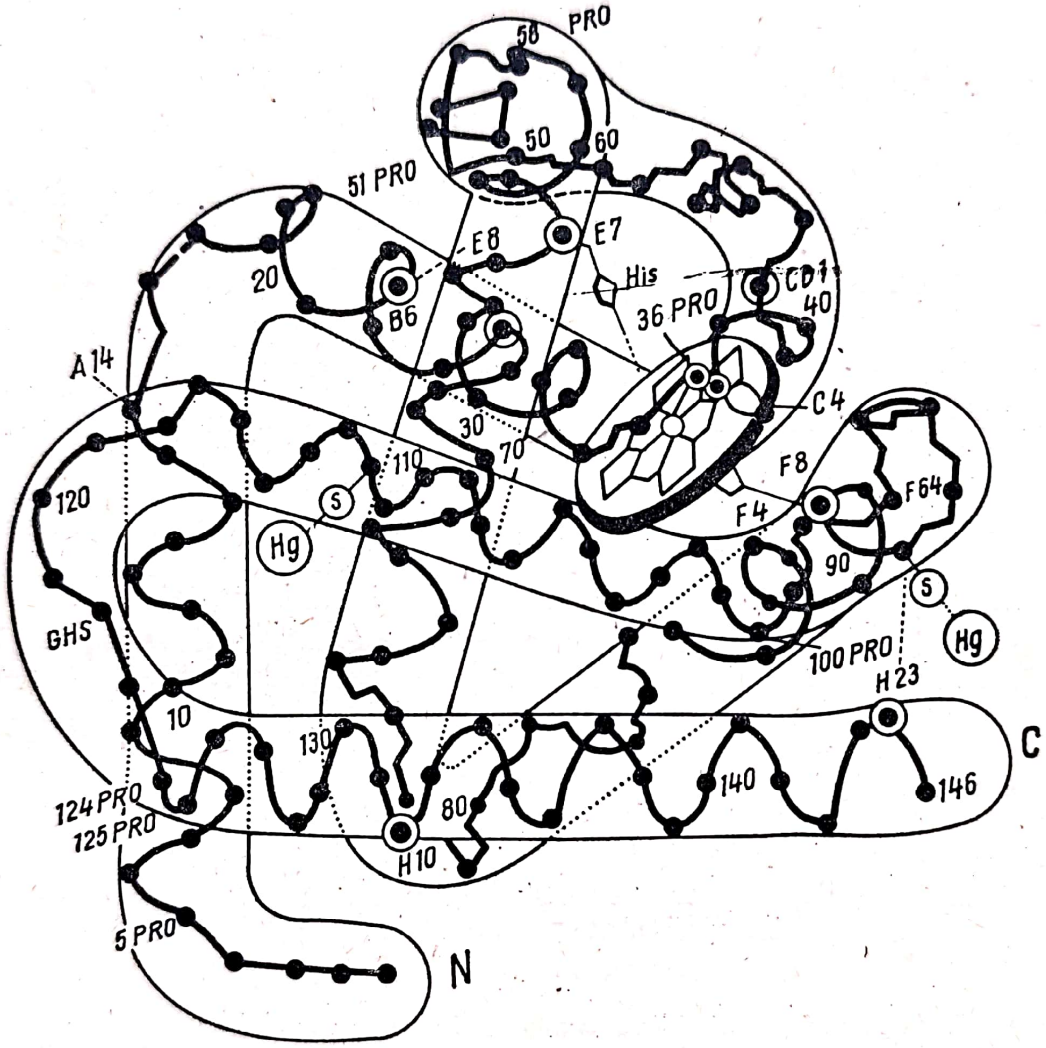


Fig. 5-11. Reprezentare stereochimică a moleculei de mioglobină (asemănătoare cu o subunitate de hemoglobină) (după R. E. Pickerson, 1965).

O catenă de hemoglobină este alcătuită din 8 segmente notate cu majuscule de la A la H şi 7 „coturi" notate cu majuscule duble (AB, BC etc.); circa 70% din acizii aminaţi sînt dispuşi în spirală. În mijloc sus este figurat inelul tetrapirolic, instalat între segmentul E şi F.

naţi polari situaţi la extremitatea lanţurilor, iar contactul între subunităţile neidentice (heterologe) — printr-un număr mai mare de contacte, care sînt însă nepolare. Anumiţi factori fizici (pH, căldura) sau produşii chimici (uree) pot dezechilibra acest ansamblu molecular producînd disocieri de tip simetric ($\alpha\alpha$ şi $\beta\beta$) sau asimetric ($\alpha\beta$ şi $\alpha\beta$), (fig. 5-13).

Prin acidifierea soluției de hemoglobină (la pH 4) se produce o disociere hemimoleculară asimetrică 2 (α+β), iar prin alcalinizare (la pH 11) — o disociere simetrică (2α și 2β). Legăturile dintre lanțurile α și β sînt mai solide decît cele dintre lanțurile omologe. Aceste disocieri sînt reversibile la pH neutru. Prin astfel de disocieri, urmate de recombinări, s-a reușit crearea unor hemoglobine hibride (de exemplu, combinarea unor catene umane cu altele de la animale), ajungîndu-se la o mai bună cunoaștere a proprietăților fizice ale hemoglobinelor (24, 117, 118, 143, 234, 272).

Cunoașterea exactă a secvenței acizilor aminați și a consecințelor determinate de proprietățile fizice și chimice ale fiecăruia în raport cu ale acizilor aminați din apropiere, a permis lui Perutz și Kendrew de la Universitatea din Cambridge, să construiască, cu ajutorul metodei difracției razelor X, un model al configurației moleculei de hemoglobină.

Structura supracuaternară (sau pentenară) nu apare decît în cazul hemoglobinelor patologice, urmare unui proces de polimerizare (vezi cap. 3 „Incluziile eritrocitare", pag. 202).

2. LEGĂTURA DINTRE HEM ȘI GLOBINĂ

Molecula de hem se instalează într-o plicatură de la suprafața moleculei de globină, rezultată din dispoziția spațială a lanțului polipeptidic între segmentele E și F. Fiecare din aceste segmente conține cîte o moleculă de histidină, situată în ax perpendicular deasupra și dedesubtul „discului" prostetic al hemului. În acest „golf" hemul este protejat și în același timp se asigură fierului condiții funcționale speciale.

Moleculele de histidină care încadrează hemul, deși se găsesc la o distanță secvențională de 29 acizi aminați, se regăsesc față în față (datorită buclei peptidice formate), permițînd moleculei de hem să se „sprijine" în ax, prin intermediul atomului de fier, pe cei 2 atomi de azot imidazolic ai histidinelor. Moleculele de histidină din poziția 87 (în lanțul α) și 92 (în lanțul β) sînt numite proximale, fiind mai apropiate de atomul de fier, iar histidinele 58 (în lanțul α) și 63 (în lanțul β) sînt numite distale fiind situate mai la distanță de el. În acest lăcaș al hemului doar moleculele de histidină sînt polare, ceilalți acizi aminați ai buclei fiind apolari (115, 234) (fig. 5-12).

În afară de cele două histidine, fenil-alanina amplasată la locul de încovoiere a segmentului CD joacă, de asemenea, un rol important în fixarea hemului. Legătura dintre fenil-alanină și nucleul tetrapirolic se bazează pe forțe de atracție van der Waals. Acești trei acizi aminați sînt prezenți în toate subunitățile de hemoglobină și mioglobină cunoscute pînă în prezent. În afară de prezența lor, ancorarea hemului la molecula de hemoglobină se sprijină și pe alte afinități, variabile după tipul de hemoglobină. La om, loja în care este amplasat hemul este „tapetată" de 60 de acizi aminați; interacțiuni complexe leagă între ele diversele resturi laterale, în mare parte polare. Doar în acest aranjament al moleculei de globină hemul găsește ambianța necesară pentru a menține fierul în stare bivalentă, capabil de a stabili legături labile cu O_2, fără a forma oxizi adevărați. Fixarea reversibilă a oxigenului de către hem nu poate avea loc deci decît dacă se află combinat cu globina. Sub această formă se poate spune că hemoglobina se oxigenează, dar nu se oxidează. Pentru menținerea acestui edificiu molecular complex cooperează, într-o măsură mai mare sau mai mică, fiecare din componentele moleculei.

Scanned with OKEN Scanner

Hemoglobinele sînt proteide dotate cu funcție respiratorie. Un litru de sînge, cu un conținut de 15 g Hb, fixează 10 mmol de oxigen. O creștere cu 1 g a concentrației de Hb duce la un aport suplimentar de aproximativ 0,8 mmol de oxigen. Fiecare grupare hem fixează cîte doi atomi de oxigen, iar o moleculă de hemoglobină fixează 8 atomi de O_2. Oxigenul poate fi transportat și de plasma sanguină, dar într-o cantitate de 70 de ori mai mică decît aceea a transportului hemoglobinei eritrocitare

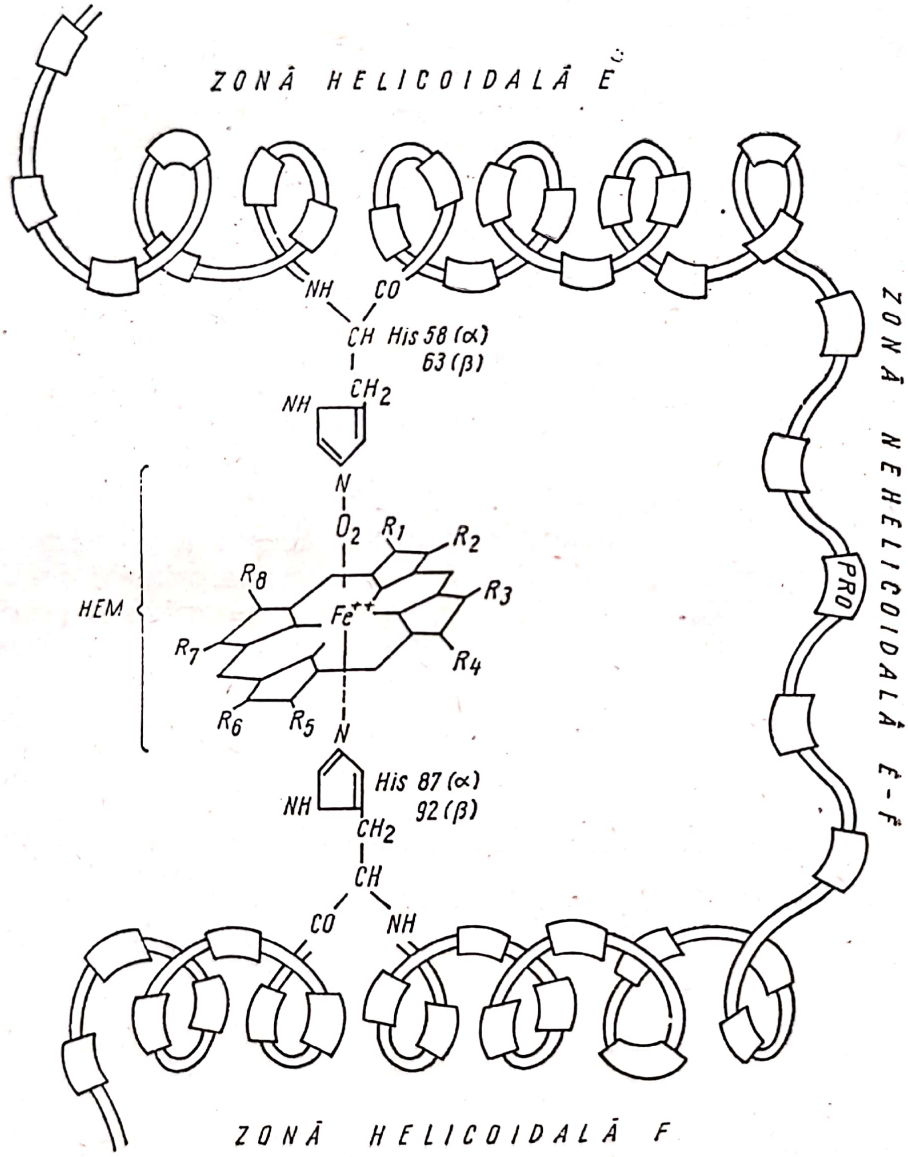


Fig. 5-12. Reprezentare schematică a unui fragment al lanțului polipeptidic de globină (segmentul E și F precum și cotul EF), cu detalierea rezidiilor histidinice de care se atașează molecula plană a hemului.

Din cele 6 legături ale fierului (2 covalente și 4 coordinative), legăturile coordinative unesc fierul de cîte o grupare imidazol a celor două molecule de histidină. Succesiunea normală a histidinelor, ce formează legăturile principale dintre globină și hem, este în poziția 58 și 87, pentru lanțul α și în poziția 63 și 92 pentru lanțul .

(21 cm^3 oxigen transportaţi de 100 mol de Hb, faţă de 0,31 cm^3 oxigen transportaţi de 100 ml de plasmă).

Între atomii de fier ai tetramerului de Hb există o sinergie în ce priveşte captarea oxigenului. Acest mecanism este determinat de prezenţa în centrul moleculei de Hb a 2-3-difosfogliceratului (DPG) care imprimă moleculei de Hb o configuraţie alosterică. În cursul fiecărei oxigenări şi dezoxigenări au loc unele modificări dimensionale ale moleculei de Hb, ceea ce îndreptăţeşte expresia de „respiraţie moleculară". Spre deosebire însă de actul respirator, creşterea de volum a moleculei se produce, nu prin fixarea oxigenului, ci tocmai prin eliberarea lui (fig. 5-13).

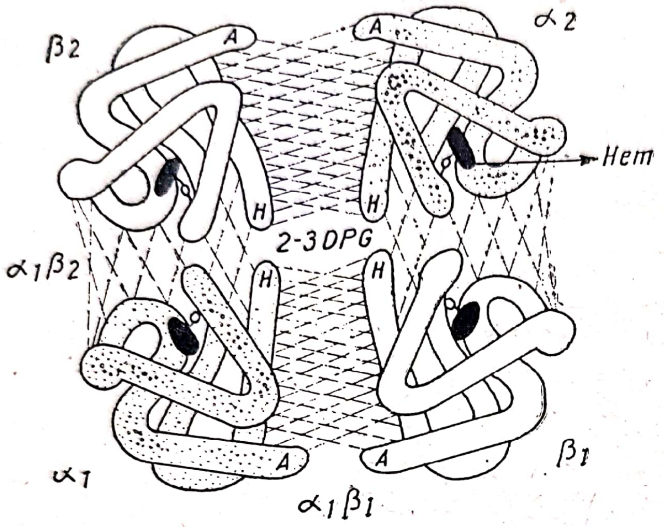


Fig. 5-13. Reprezentare schematică a tetramerului de hemoglobină şi a legăturilor necovalente dintre catene (după White, modificat de V. Bratu).

Legăturile $\alpha_1 - \beta_1$ şi $\alpha_2 - \beta_2$ sînt mai numeroase şi mai puternice decît cele $\alpha_1 - \beta_2$, respectiv $\beta_1 - \alpha_2$. Cei 4 monomeri amenajează între ei o cavitate centrală de 25/5/5 Å, „tapisată" de 28 de acizi aminaţi, toţi de tip apolar. În mijlocul acestei cavităţi pătrunde, alternativ, 2,3-difosfogliceratul (2,3-DPG), produs intermediar, rezultat din glicoliză (vezi fig. 4-18), în proporţie de mol la mol cu Hb. Cînd molecula de Hb este oxigenată, aperutra cavităţii este prea mică pentru a permite acestui metabolit să pătrundă în interiorul ei, iar cînd Hb se dezoxigenează, deschiderea este adecvată pentru a permite reintrarea 2,3-DPG în cavitatea centrală. Acest produs modulează afinitatea eritrocitelor faţă de O_2 printr-o acţiune alosterică (vezi şi fig. 1-36) (139, 303).

3. EVOLUŢIA ONTOGENETICĂ A GLOBINELOR UMANE

Pigmentul sanguin uman fiziologic nu este unitar. Această variabilitate normală este imprimată de diferenţele în succesiunea acizilor aminaţi din structura primară a monomerilor, în timp ce gruparea prostetică este invariabilă. Hemoglobina normală cuprinde mai multe tipuri de lanţuri polipeptidice, care diferă după faza de evoluţie ontogenetică a individului (embrion, făt, adult). Aceste diferenţe sînt în legătură cu condiţiile diferite de legare a oxigenului în viaţa intra- şi extrauterină. În viaţa intrauterină hematoza se desfăşoară în condiţiile unui mediu lichidian în care noua fiinţă pluteşte într-o cavitate închisă, fără să respire, fiind dependentă de oxigenul sîngelui matern, prin intermediul placentei, pe cînd în viaţa extrauterină fiinţa este independentă inhalînd oxigenul din aerul atmosferic (fig. 5-14).

a. **Hemoglobinele embrionare.** Există două tipuri de hemoglobine embrionare: tipul Gower 1 şi tipul Gower 2.

Hemoglobina Gower 1 este mai puţin cunoscută; ea este alcătuită din 4 lanţuri ϵ (ϵ_4). Hb Gower 1 se observă exclusiv la embrionul foarte tînăr, pe cînd Hb Gower 2 poate fi pusă în evidenţă, într-o proporţie de circa 0,5%, şi în sîngele din cordonul ombilical.

Hemoglobina Gower 2 este formată din 2 lanțuri α și 2 lanțuri ε după formula: $\alpha_2^A \varepsilon_2$. Electroforetic are o viteză de migrare mai lentă decît Hb Gower 1 și o alcalinorezistență intermediară între Hb F și Hb A. Cantitatea de hemoglobină embrionară diminuă pe măsură ce embrionul se dezvoltă; ea dispare cînd acesta atinge o lungime de 10 cm. Embrionul cu o talie de 25 cm conține 57% Hb F; 24% Hb Gower 2; 5% Hb Gower 1 și 1% Hb A_1.

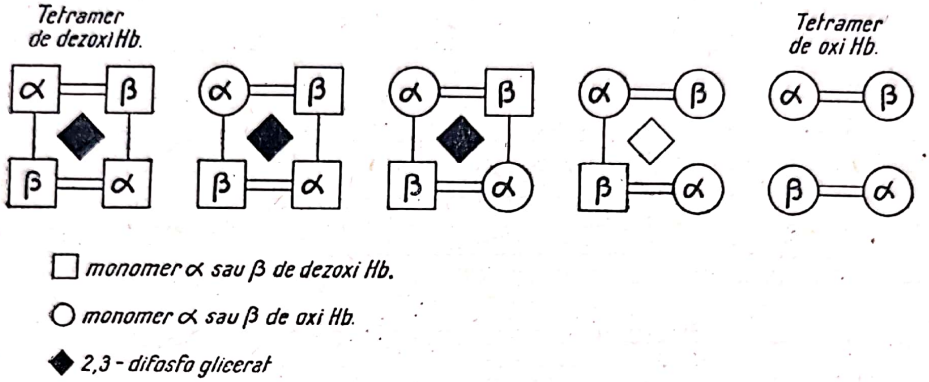


Fig. 5-14. Reprezentare figurativă a mecanismelor alosterice de legare a O_2 de molecula de hemoglobină (modificat după Perutz, 1970).

Hb se află în eritrocit sub două aspecte spațiale diferite: configurația dezoxiHb și oxiHb. Cîștigul de O_2 duce la pierderea moleculei de 2,3-DPG din centrul tetramerului și invers. Fixarea O_2 pe molecula de Hb este cu atît mai rapidă, cu cît este mai completă; ultimul monomer fixează O_2 de 200 de ori mai rapid decît primul; primul O_2 se leagă de lanțul α, iar ultimul de lanțul β. Progresia oxigenului antrenează rupturi ale legăturilor necovalente dintre lanțurile α și β (275).

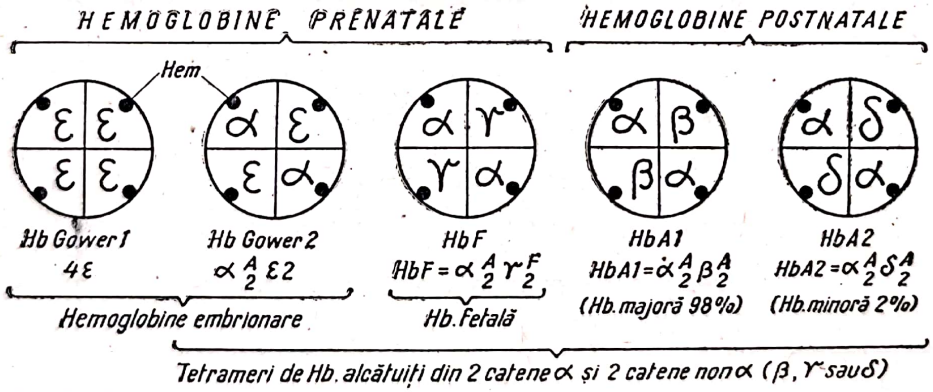


Fig. 5-15. Schema și simbolurile tetramerilor hemoglobinelor fiziologice în evoluția ontogenetică.

Tetramerul polipeptidic este format din două perechi de lanțuri identice (dimeri); hemoglobinele normale se compun dintr-un dimer fix (α_2) și dintr-un dimer variabil (β_2, γ_2, δ_2, ε_2), excepție Hb Gower 1. La făt și la adult raportul $\alpha / \beta + \gamma + \delta = 1$; în talasemii acest raport se dezechilibrează.

b. **Hemoglobinele fătului și ale nou-născutului.** Hemoglobina fetală (Hb F) este componenta normală a sîngelui fetal. Înlocuirea ei cu Hb A începe încă înainte de naștere, astfel încît la naștere sîngele cordonului ombilical conține doar 60—80% Hb F. Proporția ei scade rapid în primele luni de viață; la vîrsta de un an concentrația ei este sub 0,5%, iar la adult se găsește ca urmare (fig. 5-15).

Structural, Hb F conţine 2 lanţuri α şi 2 lanţuri γ. Spre deosebire de hemoglobina adultă, din care lipseşte izoleucina, hemoglobina fetală conţine toţi cei 20 de acizi aminaţi codificaţi în nucleu. Electroforetic, are o viteză de migrare puţin mai lentă decît Hb A. Körber (1886) a remarcat că Hb F se deosebeşte de Hb adultului printr-o relativă rezistenţă la soluţiile bazice (Hb alcalino-rezistentă). La anumite specii de animale Hb alcalino-rezistentă este forma predominantă la adult; de exemplu la iepure proporţia acesteia este de 70—80%. Hemoglobina fetală are o afinitate crescută faţă de oxigen, ceea ce favorizează transferul oxigenului de la hemoglobina maternă către cea fetală.

Ca şi pentru hemoglobina adultului, Hb F cuprinde, pe lîngă forma principală (F), mai mulţi compuşi; unele conţin în poziţia 136 glicocol, iar altele alanina. În cursul dezvoltării fetale, proporţia gli/ala este de 3 : 1, în timp ce în viaţa extrauterină este de 2 : 3. Sîngele fetal mai conţine o cantitate infimă (0,3%) dintr-un tetramer γ (γ_4). Patologic se întîlnesc cantităţi crescute de Hb F în anumite tipuri de talasemie (vezi pag. 304).

c. **Hemoglobina adultului** apare în eritrocitele fătului încă din a 13-a săptămînă de dezvoltare intrauterină.

1) *Hemoglobina majoră*

Hemoglobina A (sau A_1), numită şi Hb majoră, reprezintă 97—98% din hemoglobina adultului. Ea este compusă din 2 lanţuri polipeptidice α şi din 2 lanţuri β (formula $\alpha_2^A \beta_2^A$). Clasificarea hemoglobinelor normale şi patologice în „rapide" şi „lente" s-a făcut pe baza migrării electroforetice, etalonul de comparaţie fiind Hb A_1 (vezi şi fig. 5-27). Lanţurile α şi β conţin 19 din cei 20 de acizi aminaţi.

2) *Hemoglobine minore*

Hemoglobina A_2, numită şi hemoglobina fiziologică minoră, reprezintă 2—3% din cantitatea totală de Hb a adultului. În compoziţia ei intră 2 lanţuri polipeptidice α şi 2 lanţuri δ. Electroforetic are o migrare mai lentă. Sinteza Hb A_2 începe încă din viaţa fetală şi continuă tot restul vieţii. În anumite stări patologice (ca talasemia), proporţia ei creşte semnificativ (8).

Hemoglobina A_3 este o fracţiune de Hb „îmbătrînită" care se deosebeşte din punct de vedere chimic de Hb A_1 printr-o moleculă suplimentară de glutation fixată pe lanţul β care îi imprimă unele proprietăţi fizice deosebite, dar nici o particularitate chimică decelabilă; acest adaos nu are determinism genetic. Viteza de migrare electroforetică este mai rapidă decît a Hb A_1 (pe electroforegramă apare sub forma unei prelungiri anodice). Ea reprezintă pînă la 10% din Hb totală.

Hemoglobina A_4 a fost izolată de Labie, Schapira şi Dreyfus în sîngele păstrat timp îndelungat *in vitro*.

d. **Asemănări şi deosebiri onto- şi filogenetice ale hemoglobinelor.** Lanţul α este prezent în hemoglobina umană începînd cu primele săptămîni ale vieţii intrauterine şi în continuare pînă la sfîrşitul vieţii. În timp ce lanţurile α sînt prezente constant în toate formele de Hb, lanţurile ε, γ, β şi δ, care dublează lanţurile α, se înlocuiesc succesiv în cursul dezvoltării ontogenetice. Situaţii de acest fel se întîlnesc şi la alte

Scanned with OKEN Scanner

specii, de exemplu Hb mormolocului diferă de aceea a broaștei mature, iar Hb embrionului de găină diferă de aceea a găinii adulte. Analizîndu-se numărul de deosebiri (înlocuiri) în secvența de acizi aminați între lanțurile α, β, γ, δ, ε și mioglobină, s-a putut stabili ordinea în care ar fi luat naștere aceste variante prin duplicarea unei gene ancestrale comune și mutații ulterioare în gena duplicată. Pentru hemoglobinele umane deosebirile cele mai mari se găsesc între lanțurile α și β (83 de necorespondențe). În ordine descrescîndă urmează deosebirile între lanțurile α și β cu 78 de necorespondențe etc. În cadrul aceleeași familii de lanțuri (β, γ, δ), deosebirile sînt mai mici, astfel între lanțurile β și γ există 36 de deosebiri, iar între β și δ sînt doar 10, de unde rezultă că ultimele s-au separat mai recent. Cele mai importante deosebiri în secvențele de acizi aminați se găsesc între lanțul de mioglobină și catenele hemoglobinice (41). Cum fiecare lanț polipeptidic este determinat de cîte o genă separată, aceste constatări duc la presupunerea că deosebirile sînt cu atît mai importante, cu cît distanțele dintre gene pe lanțul ADN sînt mai mari (115, 196).

În afară de asemănările și deosebirile ontogenetice, structura lanțurilor polipeptidice ale hemoglobinei prezintă, pe anumite porțiuni, identități remarcabile și pe scara filogenetică, ceea ce aduce dovezi în plus pentru originea comună a pigmentului respirator, cît și precizări asupra gradului de înrudire taxonomică a speciilor pe baza numărului de concordanțe în secvențele de acizi aminați. Toate hemoglobinele animale au provenit dintr-o hemoglobină primitivă, formată dintr-o singură unitate, asemănătoare ca structură cu mioglobina. Celelalte catene ar fi apărut în ordinea următoare: α, γ, β și δ. Cu cît speciile sînt mai apropiate pe scara filogenetică, cu atît deosebirile în structura hemoglobinelor sînt mai mici. De exemplu, hemoglobinele gorilei și ale cimpanzeului dau amprente identice cu ale omului, pe cînd Hb maimuței Rhesus prezintă unele diferențe. Hemoglobina unui vertebrat inferior (Ciclostoma Lampetra) este alcătuită dintr-un singur lanț polipeptidic combinat cu o grupare heminică.

În toate globinele cunoscute (chiar în cele mai îndepărtate filo- și ontogenetic), o serie de acizi aminați rămîn, invariabil, în aceeași poziție. Aceștia ar avea rolul de a menține configurația tridimensională a globinei („stîlpii de susținere") în vederea unirii ei cu molecula de hem.

B. HEMOGLOBINOZE

În afară de hemoglobinele normale se cunoaște astăzi un număr important și mereu în creștere de hemoglobine anormale. Sub termenul de hemoglobinopatie numeroși specialiști înțeleg defectele rezultate din mutații ale genelor structurale ale lanțurilor globinice, iar sub termenul de hemoglobinoze, pe cele consecutive mutațiilor genelor reglatoare. Din tulburările sintezei hemului nu rezultă hemoglobine anormale (42, 53, 83, 137, 143, 172, 185, 273, 303, 341).

Scanned with OKEN Scanner

Nomenclatură. Prima hemoglobină patologică descrisă a fost siclemia descoperită de Linus Pauling și colab. în 1949 (236) pe baza caracterelor de migrare electroforetică; ea a fost notată cu litera S pentru a sugera anomalia eritrocitară rezultată (cuv. engl. *sickle*=seceră) (236). Pentru a le distinge de celelalte hemoglobine, hemoglobina normală a fost notată cu litera A (de la cuvîntul „adult"), iar cea fetală cu litera F. Majuscula B a fost folosită mai recent pentru a indica o variantă patologică a hemoglobinei A_2, cu modificări structurale la nivelul lanțului δ. A urmat apoi notarea altor 3 hemoglobine patologice cu răspîndire mare pe glob: hemoglobinopatiile C, D și E. În scurt timp au fost descrise, tot pe baza criteriului de migrare electroforetică, mai multe zeci de hemoglobine patologice, încît literele alfabetului au devenit insuficiente pentru a le cuprinde pe toate; în plus acest sistem prezintă numeroase inexactități. Pentru unele hemoglobine patologice notate după criteriul alfabetic, a fost aleasă prima literă a cuvîntului care caracterizează tulburarea clinică principală a bolii (de exemplu: Hb M de la „methemoglobină", Hb S— de la „sickle cell"). Alteori s-a folosit inițiala țării sau a zonei geografice unde a fost descoperită (cu condiția ca aceste litere să nu fi fost folosite în prealabil pentru alte hemoglobine), de exemplu Hb L — de la „Liberia", Hb K — de la „Kabilia" (Algeria). Dacă mai multe hemoglobine patologice au aceeași viteză de migrare, ele poartă, pe lîngă majuscula respectivă, denumirea localității unde au fost descoperite, de exemplu: Hb J. Oxford, Hb J. Paris, Hb J. Baltimore etc.; altele poartă denumirea localității, fără să fie precedate de nici o majusculă, ca Hb Zürich, Hb Frieburg, Hb București etc. Unele poartă numele prescurtat al spitalului unde au fost descoperite ca Hb Bart's, de la „Saint Bartholomews Hospital" din Londra, iar altele au primit numele bolnavilor purtători ai tarei respective (ca Hb Lepore, Hb Hope etc.). Într-un timp scurt s-a ajuns cu notarea pînă la litera Q (litera S fiind notată anterior pentru prima hemoglobină descrisă); litera R nu a mai fost folosită. Unele litere ale alfabetului cuprind 2—15 hemoglobine anormale, din care unele total diferite între ele ca structură primară sau aparținînd chiar unor lanțuri diferite, în timp ce altele sînt identice dar au fost descrise în zone geografice diferite. Criteriul de separare a hemoglobinopatiilor după migrarea electroforetică s-a dovedit deci imperfect, hemoglobine diferite putînd avea aceeași viteză de migrare; electroforeza nu poate să deceleze decît acele modificări ale moleculei de hemoglobină care se însoțesc de schimbarea numărului de sarcini electrice.

Din toate aceste motive s-a simțit nevoia creerii unei noi nomenclaturi internaționale. În 1964 a avut loc la Stockholm Congresul societății internaționale de hematologie la care s-a hotărît ca majusculele folosite pentru hemoglobinopatiile etichetate anterior să fie menținute în continuare dar să nu se utilizeze mai departe literale alfabetului ci noile hemoglobine să poarte, în viitor, numele laboratorului, al spitalului sau al orașului în care sînt descoperite. În cazurile în care se stabilește cu precizie structura moleculară, aceasta să fie semnalată cu indicarea acidului aminat înlocuit și a poziției ocupate de acesta în lanțul afectat. De exemplu, pentru siclemie, formula, care înainte se scrie $\alpha_2^A \beta_2^S$ se va completa după cum urmează: $\alpha_2^A \beta_2^{6Glu \rightarrow Val}$. Aceasta este singura soluție complet satisfăcătoare din punct de vedere științific (54, 117, 248, 287).

Studiul patogeniei bolilor hemoglobinei, deși de dată relativ recentă, a înregistrat, într-un interval scurt, progrese considerabile, fără să se fi ajuns totuși la o clarificare completă în toate situațiile.

1. CLASIFICAREA HEMOGLOBINOZELOR

Stadiul actual al cunoștințelor asupra structurii și efectelor biologice a globinelor patologice a dus la numeroase clasificări bazate pe criterii ontogenetice, clinice, patogenetice, a structurilor chimice etc. a hemoglobinelor, dar nici una nu este în măsură să cuprindă unitar toate aceste criterii. De aceea, toate clasificările adoptate în prezent au caracter

Scanned with OKEN Scanner

provizoriu. Urmărind criterii diferite de clasificare, tipurile de hemoglobine normale și patologice pot fi grupate astfel:

I) **Tipuri de hemoglobine normale și patologice fără modificări mutaționale**

A) *Hemoglobine normale în cursul evoluției ontogenetice*

1) *Hb embrionare:* Hb Gower 1 (ε_4). Hb Gower 2 ($\alpha_2^A\ \varepsilon_2$).

2) *Hb fetală:* Hb F ($\alpha_2^A\ \gamma_2^F$).

3) *Hb adulte:*

a) Hemoglobina majoră: A_1 ($\alpha_2^A\ \beta_2^A$) sau predominantă (circa 98%).

b) Hemoglobina minoră: Hb A_2 ($\alpha_2^A\ \delta_2^A$) sau Hb minoritară (2—3%).

B) *Hemoglobine cu modificări nemutaționale* (chimice sau secundare)

1) *Hb* A_3 cu o modificare a migrării electroforetice provocată, probabil, de oxidarea unei grupări SH în lanțul β;

2) *Hb* A_{1a}, A_{1b}, A_{1c} etc., sînt constituenți normali detectați cromatografic;

3) *Hb Koelicker* (Hb $\alpha_2^{141\ Arg\rightarrow 0}$), deleția ultimului acid aminat, dobîndită, probabil, prin acțiunea carboxipeptidazei plasmatice;

4) *Hb Pb* este o hemoglobină cu migrare lentă, întîlnită în intoxicații cu plumb.

II) **Modificări de hemoglobină prin alterare genică**

A) *Hemoglobine prin anomalii ale genelor structurale* (calitative): Hb S, Hb C, Hb E etc.

B) *Hemoglobinoze rezultate din afectarea genelor reglatoare* (cantitative): sindromul talasemic.

III) **După consecințele clinice induse:**

A) *Fără manifestări clinice* (mutații „liniștite"): majoritatea mutațiilor pe lanțurile de structură, precum și stările cu persistența hemoglobinei F.

B) *Cu manifestări clinice*

1) *Grave:* Hb S, Hb instabile, talasemiile.

2) *Moderate* (chiar și în formele homozigote); Hb C, Hb E etc.

IV) **După răspîndirea în populația globului**

A) *Cu răspîndire în masă:* talasemia β, Hb S, Hb C, Hb D și Hb E.

B) *Cu răspîndire restrînsă* sau sporadică: celelalte mutații.

V. **După cantitatea și tipul de hemoglobină anormală**

A) *Hemoglobinopatii homozigote* (cu tara moștenită de la ambii părinți); formele clinice sînt evidente (de exemplu în Hb CC), alteori sînt foarte grave (de exemplu în Hb SS).

B) *Hemoglobinopatii heterozigote* (cu tara moștenită de la unul din părinți); formele clinice sînt mai atenuate (Hb A S etc.) sau inaparente (Hb A E etc.).

C) *Hemoglobinopatii dublu heterozigote:* gravitatea

Scanned with OKEN Scanner

clinică este asemănătoare celor homozigote, cu aspecte intermediare între cele două forme.

1) *Hemoglobinopatii combinate ale lanţurilor de structură:* Hb S C (ambele pe lanţul β), Hb S G (pe lanţuri diferite).

2) *Hemoglobinopatii combinate ale lanţurilor structurale cu cele reglatoare:* Hb S + talasemie.

VI) **După consecinţele asupra configuraţiei, funcţiei şi stabilităţii moleculei de hemoglobină**

A) *Cu apariţia de structuri pentenare* (polimerizarea moleculelor de hemoglobină în eritrocite).

1) Cu prezenţa de *tactoizi* (polimerizare în baghete): Hb S.

2) Cu prezenţa de *corpi Heinz* (polimerizare globuloasă): Hb Zürich, Hb Köln, Hb Bucureşti etc.; acestea se mai numesc Hb instabile; clinic se caracterizează printr-o mare predispoziţie la hemoliză.

3) Cu formare de *cristale:* Hb C.

B) *Cu funcţie anormală a hemului* (Fe trivalent): hemoglobinopatiile methemoglobinizante (tip Boston, Iwate, Saskatoon, Hyde Park etc.).

C) *Cu afinitate anormală pentru oxigen.*

1) *Cu afinitate crescută (poliglobulie):* Hb Chesapeake.

2) *Cu afinitate scăzută:* Hb Kansas.

3) *Cu legare anormală a hemului de globină;* 2 hem/4 globine: Hb Gun Hill ($\alpha_2^A \beta_2^A$ cu deleţia 91—97)

VII) **După numărul de mutaţii în acelaşi lanţ;** se cunoaşte o singură hemoglobinopatie cu dublă anomalie: Hb S + Hb C tip Harlem, explicată fie prin crossing over, fie prin apariţia unei mutaţii la un siclemic.

VIII) **După lungimea lanţului polipeptidic mutant**

A) *Hemoglobine cu lanţuri scurte* (deleţii): Hb Gun Hill.

B) *Hemoglobine cu lanţuri lungi:* Hb Tak cu un plus 10 acizi aminaţi la capătul C terminal al lanţului β.

IX) **Aranjamente anormale ale tetramerilor polipeptidici şi apariţia de lanţuri polipeptidice hibride**

A) *Cu tetrameri omologi:* Hb H (β_4), Hb Bart's (γ), Augusta 1 (β_4^S), Augusta 2 (β_4^C).

B) *Globine cu lanţuri hibride:* Hb tip Lepore (fuziune între porţiunea incipientă a lanţului β cu porţiunea terminală a lanţului δ) (tabelul 5-3).

2. PATOGENIA HEMOGLOBINOZELOR

a. Mutaţii ale genelor structurale

1) *Variante anormale ale hemoglobinei adulte majore* (catenele α şi β). Mutaţiile „punctiforme" (înlocuirea unui singur acid aminat dintr-un lanţ polipeptidic) pot avea loc, teoretic, în oricare din lanţurile normale (α, β, γ, δ, ε) şi în orice poziţie din structura primară a lanţurilor α (cu 141 de acizi aminaţi) sau non α (cu 146 de acizi

Tabelul 5-2

Mutații ale lanțului α

Hemoglobina	Poziția	Mutația	Particularități clinice și de laborator
J. Torento	5	Ala → Asp	
Savara	6	Asp → Ala	
J. Paris	12	Ala → Asp	
I. Interlaken	15	Gli → Asp	
J. Oxford	15	idem	
Ottawa	15	Gli → Arg	
I	16	Lis → Glu	
J. Nyanza	21	Ala → Asp	
J. Medellin	22	Gli → Asp	
Memphis	23	Glu → Gln	
Chad	23	idem	
G. Andhali	23	Glu → Val	
G. Fort Worth	27	Glu → Gli	
Lapin	29	Val → Leu	
G. Chinese	30	Glu → Gln	
G. Honolulu	30	idem	
G. Hong Kong	30	idem	
G. Singapore	30	idem	
O. Padua	30	Glu → Lis	
Constant Spring	31	Supra reziduu la capătul C terminal	Hb H în combinație cu talasemia
Torino	43	Fen → Val	Hb inst. An. hem.
L. Ferrara	47	Asp → Gli	Lab. term. (Hb. instab.)
L. Belinston	47	idem	idem
Columbia	47	idem	idem
L. Tagawa	47	idem	idem
L. Umi	47	idem	idem
L. Yukushashi 2	47	idem	idem
Kokura	47	idem	idem
Hasharon	47	Asp → His	Hb inst. An. hem±
Sealy	47	idem	idem
Sinai	47	idem	idem
J. Sardegna	50	His → Asp	
J. Abidjan	51	Gli → Asp	
Russ	51	Gli → Arg	
J. Rovigo	53	Ala → Asp	
Shimonoseki	54	Gln → Arg	
Hiroshima	54	idem	
Mexico	54	Gln → Glu	
Paris 2	54	idem	
Norfolk	57	Gli → Asp	
Kagoshima	57	idem	
Nishiki	57	idem	
L. Golf Persic	57	Gli → Arg	
M. Boston	58	His → Tir	Met Hb
Osaka	58	idem	idem
Gothenburg	58	idem	idem
Kiskunhalas	58	idem	idem
Zambia	60	Lis → Asn	
Budapesta	61	Lis → Asn	

Scanned with OKEN Scanner

Continuare tabelul 5-2

Hemoglobina	Poziția	Mutația	Particularități clinice și de laborator
Aida	64	Asp → Asn	
G. Waimanalo	64	idem	
Q. India	64	Asp → His	
G. Philadelphia	68	Asn → Liz	
G. St. Louis	68	idem	
Washington	68	idem	
G. Bristol	68	idem	
G. Baltimore	68	idem	
Knoxville 1	68	idem	
Ube 2	68	Asn → Asp	
J. Habana	71	Ala → Gln	
Dameshgah-Teheran	72	His → Arg	
Manidol	74	Asp → His	
Q. Iran	75	Asp → His	
Winnineg	75	Asp → Tir	
Stanleyville	78	Asn → Liz	
J. Singapore	78	Asn → Asp	
Y. Singapore	79	Ala → Gli	
Ann Arbor	80	Leu → Arg	
Etobikoke	84	Ser → Arg	Hb. inst.
G. Norfolk	85	Asp → Asn	
Atago	85	Asp → Tir	
M. Iwate	87	His → Tir	Met Hb.
Kankakee	87	idem	idem
Strebata	87	idem	idem
Ohlemberg	87	idem	idem
Broussais	90	Lis → Asn	
Tagowa 1	90	idem	
J. Rahappen	90	Lis → Tir	
J. Capetown	92	Arg → Glu	Afin > O_2
Chesapeake	92	Arg → Leu	Poiligl. Afin > O_2
G. Georgia	95	Pro → Leu	
Rampa	95	Pro → Ser	
Denmark Hill	95	Pro → Ala	
Manitoba	102	Ser → Arg	
Dakar	112	His → Gln	
Hopkins 2	112	His → Asp	
Chiapas	114	Pro → Arg	
J. Tongariki	115	Ala → Asp	
O. Indonezia	116	Glu → Liz	
J. Meerut	120	Ala → Gln	
J. Birmingham	120	idem	
Bibba	136	Leu → Pro	Hb. inst. An. hem.
Singapore	141	Arg → Pro	
Koelliker	141	Arg → O	Deleție. Hb dobîndită prin carboxipeptidază (?), hemoliză
Constant Spring,	141	31 de rezidii adiționale (total 172 acizi aminați)	
Icaria	141		
Koya Dora	141		

Scanned with OKEN Scanner

Continuare tabelul 5-2

Hemoglobina	Poziția	Mutația	Particularități clinice și de laborator
		Mutații ale lanțului β	
Tokuchi	2	His → Tir	An. hem.
Deer Lodge	2	His → Arg	
S	6	Glu → Val	Siclizare. Răspîndire de masă
C	6	Glu → Liz	Nesiclizare. Răspîndire de masă
G. Makassar	6	Glu → Ala	
Leiden	6 sau 7	Glu → O	Deleție. Hb. inst. Hemoliză
G. San Jose	7	Glu → Gli	
C. Georgetown	7	Glu → Liz	Siclizare
Siriraj	7	idem	
Porto Alegre	9	Ser → Cis	Siclizare
Sögn	14	Leu → Arg	
Abraham Lincoln	14	Leu → Pro	Hb instabilă
Belfast	15	Tri → Arg	Alter. afinit. pt. O_2
J. Baltimore	16	Gli → Asp	
D. Bushman	16	idem	
Ireland	16	idem	
Trinidad	16	idem	
New Haven	16	idem	
Nagasaki	17	Lis → Glu	
D. Ouled Robah	19	Asn → Lis	
Olimpia	20	Val → Met	
G. Coushatta	22	Glu → Ala	
E. Sascatoon	22	idem	
Shin — Chu	22	idem	
Taipei	22	Glu → Gli	
M. Freiburg	23	Val → O	Deleție. Met. Hb. Afin. > O_2. Lab. term.
Riverdale-Bronx	24	Gli → Arg	Hb inst.
Savannah	24	Gli → Val	Hb inst.
G. Taivan Ami	25	Gli → Arg	
E	26	Glu → Liz	Răspînd. masă. Manifest. discrete
Genova	28	Leu → Pro	Hb inst.
St. Louis	28	Leu → Gln	Hb inst.
Tacoma	30	Arg → Ser	Hb A_2
Perth	32	Leu → Pro	
Philly	35	Tir → Fen	An. hemol. ±
Hirose	37	Pro → Ser	Afin. > O_2
Hammersmith	42	Fen → Leu	Hb inst. (Anemie hemol. severă)
București	42	Fen → Leu	Afin. > O_2 An. hemol. ±
Mequon	42	Fen → Tir	Hb inst.
Niteroi	42—44 sau 43—45	Fen, Glu, Ser în deleție idem	
G. Galveston	43	Glu → Ala	
K. Ibadan	46	Gli → Glu	
G. Copenhaga	47	Asp → Asn	

Scanned with OKEN Scanner

Hemoglobina	Poziția	Mutația	Particularități clinice și de laborator
Okaloosa	48	Leu → Arg	
Edmonton	50	Thr → Lis	
Osu Christiansburg	52	Asp → Asn	
Ocho Rios	52	Asp → Ala	
J. Bangkok	56	Gli → Asp	
Meinung	56	idem	
Korat	56	idem	
Dhofar	58	Pro → Arg	
Iukuhashi	58	idem	Er. în țintă
J. Kaoshiung	59	Lis → Thr	
I. High Wycombe	59	Lis → Glu	
N. Seattle	61	Lis → Glu	60% Hb în formele heterozigote
Hikari	61	Lis → Asn	idem
Duarte	62	Ala → Pro	
M. Saskatoon	63	His → Tir	Met Hb.
Kurume	63	idem	idem
Chicago	63	idem	idem
Arhus	63	idem	idem
Zürich	63	His → Arg	Hb inst. Anemie hemolitică f. ușoară
I. Toulouse	66	Lis → Glu	Hb inst.
M. Milwanchee 1	67	Val → Glu	Meth. Hb.
Bristol	67	Val → Asp	Afin $< O_2$. Met Hb ±
Sydnei	67	Val → Ala	Hb inst. Electroforeză norm.
J. Cambridge	69	Gli → Asp	
Rambam	69	idem	
Seattle	70	Ala → Glu	Hb inst.
Christchurch	71	Fen → Ser	Hb inst.
C. Harlem	73	Asp → Asn	Siclizare
Kore Bu	73	Asp → Asn	idem
Shepherd's Bush	74	Gli → Asp	An. hemol. Afin O_2 alterată
St. Antoine	74—75	Gli, Leu deleție	
Seattle	76	Ala → Glu	Afin. $< O_2$
J. Iran	77	His → Asp	
G. Accra	79	Asp → Asn	
G. Hsi-Tsou	79	Asp → Gli	
Gifu	80	Asn → Liz	
G. Shuhu	80	idem	
Ta Li	83	Gli → Cis	
Pyragos	83	Gli → Asp	
Buenos Aires	85	Fen → Ser	Hb inst.
D. Ibadan	87	Tre → Liz	
Tours	87	Tre deleție	Hb inst.
Santa Ana	68	Leu → Pro	Hb inst.
Boras	88	Leu → Arg	Hb inst.
Agenogi	90	Glu → Liz	Afin $< O_2$
Sabine	91	Leu → Pro	Hb inst.
M. Hyde Park	92	His → Tir	Met Hb
Akita	92	idem	idem

Scanned with OKEN Scanner

Continuare tabelul 5-2

Hemoglobina	Poziția	Mutația	Particularități clinice și de laborator
St. Etienne	92	His → Gln	Hb inst.
Istambul	92	His → Glu	
Ube 1	93	Cis blocat	Hb inst.
Oak Ridge	94	Asp → Asn	
N	95	Liz → Glu	
N. Baltimore	95	Liz → Asp	
N. Jenkins	95	idem	
N. Memphis	95	idem	Siclizare
Hopkins 1	95	idem	
New Haven	95	idem	
Gun Hill	91—97	Deleție	Hb inst.
	91—95	idem	idem
	92—96	idem	idem
Malmö	97	His → Gln	Afinitate alterată pt. O_2
Köln	98	Val → Met	idem
Nottingham	98	Val → Gli	
Yakima	99	Asp → His	Poliglob. Afin > O_2
Kempsei	99	Asp → Asn	idem
Ypsilanti	99	Asp → Tir	idem
Brigham	100	Pro → Leu	
Rush	101	Glu → Gln	Hb inst.
Kansas	102	Asn → Tre	Afin > O_2. cianoză
Richmond	102	Asn → Lis	
Heathrow	103	Phe → Leu	
Casper	106	Leu → Pro	
Southampton	106	idem	Hb inst.
Yoshizaka	108	Asn → Asp	
San Diego	109	Val → Met	
Peterborough	111	Val → Fen	Anemie ±
New York	113	Val → Glu	
P	117	His → Arg	
Hijiyama 2	120	Val → Glu	
O. Arabia	121	Glu → Liz	
D. Punjab	121	Glu → Gln	Răspînd, masă
D. Los Angeles	121	idem	
D. Cipru	121	idem	
D. Conley	121	idem	
D. Chicago	121	idem	
D. Portugal	121	Glu → Val	
Beograd	121	idem	
Khartoum	124	Pro → Arg	
Hofu	126	Val → Glu	
Erie	127	Gln deleție	Hb inst.
J. Taichung	129	Ala → Asp	
K. Camerum	129	Ala → Glu	
Viena	130	Tir → Asp	Hb inst.
Camden	131	Gln → Glu	
K. Woolwich	132	Liz → Glu	
Hope	136	Gli → Asp	Poliglob. Afin > O_2
Omlsted	141	Leu → Arg	Hb inst.
Abruzzo	143	His → Arg	
Hiroshima 1	143	His → Asp	

Scanned with OKEN Scanner

Hemoglobina	Poziția	Mutația	Particularități clinice și de laborator
Kenwood	143	idem	
Little Rock	143	His → Gln	Alter, afin. pt. O_2
Rainer	145	Tir → His	Poliglob. Afin > O_2
Bethesda	145	idem	Poliglob.
Hiroshima	146	His → Asp	Alter. afin. pt. O_2
Tak	146	10 acizi aminați suplinitori la C terminal	
Mutații ale lanțului γ			
F. Texas 1	5	Glu → Liz	
F. Texas 2	6	idem	
F. Kuala Lumpur	22	Asp → Gli	
F. Jamaica	61	Lis → Glu	
F. Dickinson	97	His → Arg	
F. Malta	117	His → Arg	
F. Alexandra	12	Tir → Liz	Siclizare
F. Hull	121	Glu → Liz	
F. Poole	130	Try → Arg	
F. Malaysia	136	Gli → Cis	
Mutații ale lanțului δ			
A_2 Sphakia	2	His → Arg	
A_2 N.Y.U.	12	Asn → Liz	
A_2 (sau B_2)	16	Gli → Ala	
A_2 Flatbush	22	Ala → Glu	
A_2 Babinga	136	Gli → Asp	
Alte mutații			
Hb H	α_4A		Făt neviabil. Anasarcă
Augusta 1	β_4S		
Augusta 2	β_4C		
Bart's	γ_4F		
Portland 1	γX_2X		Siclizare
Fuziuni între lanțurile δ—β (tip Lepore), β—δ anti-Lepore și între γ—β			
Lepore Boston	δ—β	Fuziune 86—115	Clinic ca o formă de talasemie homozigotă
Lepore Pilos	δ—β	idem	idem
Lepore Hollandia	δ—β	Fuziune 23—49	idem
Lepore Baltimore	δ—β	idem	idem
Anti-Lepore Miyada	β—δ	idem	idem
Anti-Lepore Congo	β—δ		
Anti-Lepore Nilotic	β—δ		
Kenia	γ—β	γ 80—87	

Scanned with OKEN Scanner

aminaţi). Astfel, un acid aminat care ocupă o anumită poziţie în unul din aceste lanţuri ar putea fi înlocuit cu 19 din cei 20 de acizi aminaţi existenţi. Din miile de variante care ar putea rezulta, nu se cunosc în practică decît aproximativ 150 de mutaţii, însă numărul real este, cu siguranţă, mult mai mare, mai ales a acelor mutaţii care nu se exprimă clinic şi a celor cu frecvenţă sporadică, dovadă faptul că mereu se comunică forme noi care aşteaptă să fie „omologate" (36, 243). Pe lanţul α se cunosc aproximativ 40 de înlocuiri ale acizilor aminaţi numeroase din ele fiind descoperite în puncte geografice şi la rase diferite. Lanţul β, cu toate că este numai cu 5 acizi aminaţi mai lung decît lanţul α, prezintă aproximativ 80 de tipuri diferite de mutaţii cunoscute pînă astăzi. Cele patru hemoglobinopatii cu răspîndire de masă (Hb S, Hb C, Hb D şi Hb E), care afectează peste 100 de milioane de locuitori ai globului, aparţin toate lanţului β (fig. 5-16).

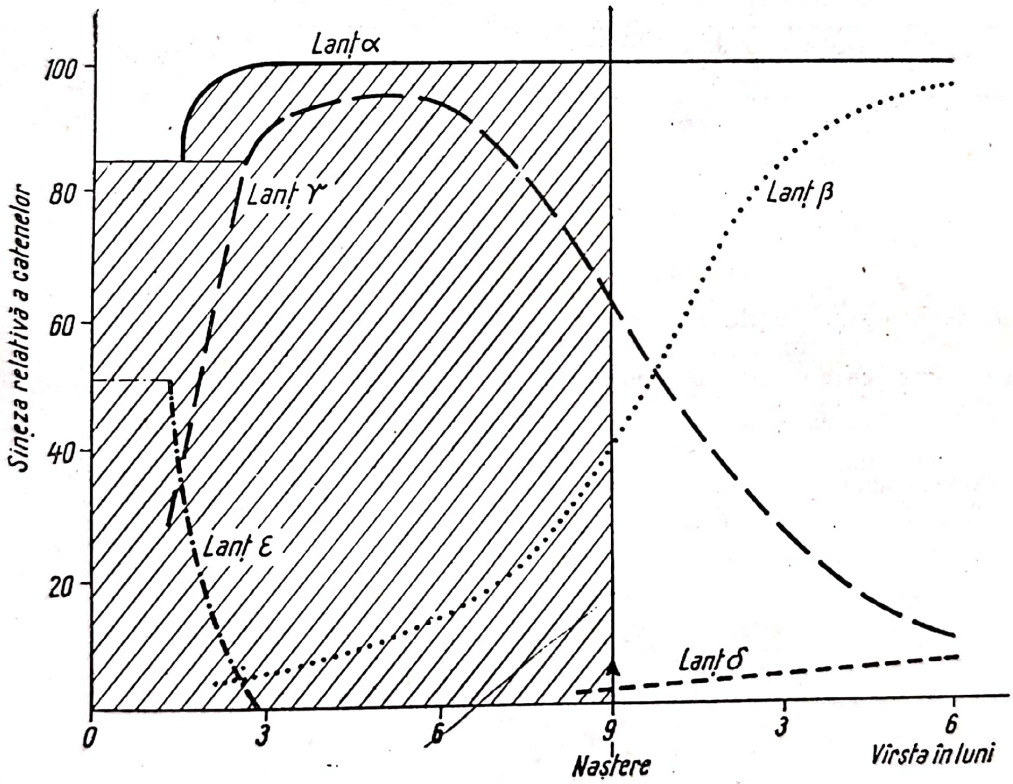


Fig. 5-16. Sinteza catenelor polipeptidice ale moleculei de hemoglobină în viaţa intrauterină şi postnatală (după E. Zuckerkandl, 1965).

a) *Mutaţii ale extremităţii N terminale ale lanţului* β. Această zonă este bogată în mutaţii; pînă la acidul aminat din poziţia 9 există 7 mutaţii cunoscute, dintre care 5 interesează poziţiile 6 şi 7, ambele ocupate de acidul glutamic (fig. 5-17). Mutaţiile acestui segment ilustrează, consecinţele clinice pe care le poate avea atît înlocuirea tipului de acid aminat, cît şi poziţia pe care o ocupă acesta în lanţul polipeptidic. Mutaţia aceluiaşi acid aminat poate fi situată într-o poziţie „strategică" sau neesenţială pentru structura şi funcţiile hemoglobinei (vezi şi fig. 3—35).

Înlocuirea acidului glutamic din poziţia 6 cu valina dă naştere celei mai răspîndite şi poate celei mai grave hemoglobinopatii, siclemia (fig. 5-18) pe cînd din înlocuirea aceluiaşi acid glutamic cu lizina rezultă o hemoglobinopatie cu răspîndire de masă (Hb C), dar cu manifestări clinice incomparabil mai atenuate şi care nu prezintă fenomenul de siclizare. Înlocuirea acidului glutamic din poziţia 7, tot cu lizină, provoacă însă siclizarea (Hb C Georgetown).

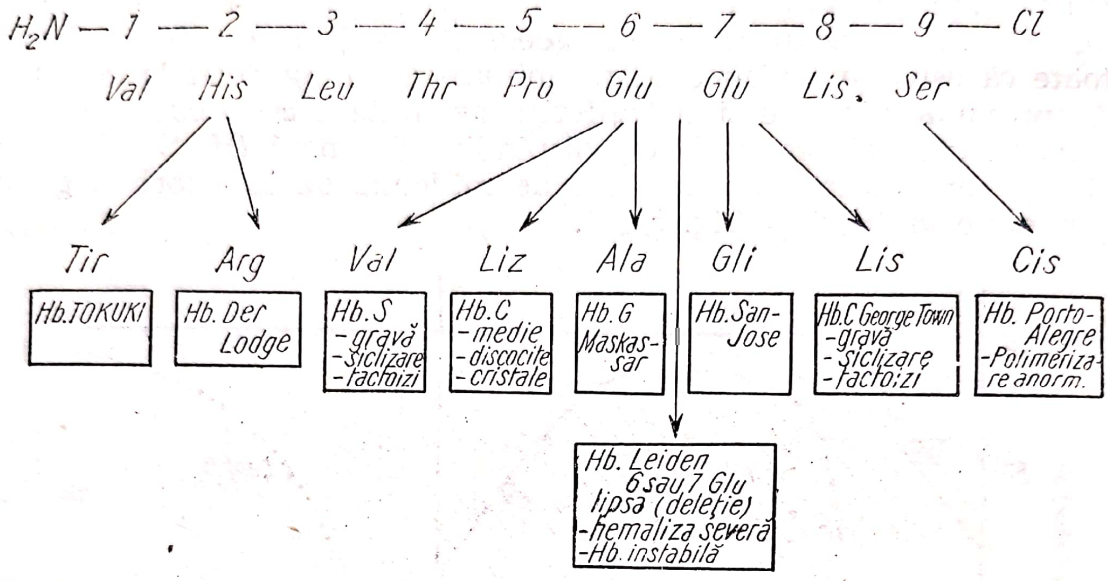


Fig. 5-17. Exemple de mutaţii la nivelul extremităţii N terminale a lanţului β (modificat după I. Rosa şi colab., 1967).

De remarcat că atît natura acidului aminat care face substituirea, cît şi poziţia lui în lanţul polipeptidic, conferă caracterul manifestărilor clinice şi hematologice; de exemplu, substituirea acidului glutamic din poziţia 6, prin valină determină drepanocitoza (boală cu gravitate extremă), pe cînd înlocuirea acidului glutamic prin lizină determină hemoglobinopatia C, boală cu manifestări clinice mai uşoare; înlocuirea acidului glutamic cu lizină în poziţia 7, deşi are aceeaşi migrare electroforetică cu HbC, produce siclizarea eritrocitelor; înlocuirea acidului glutamic din poziţia 6 sau 7 produce o anemie hemolitică şi hemoglobină instabilă etc.

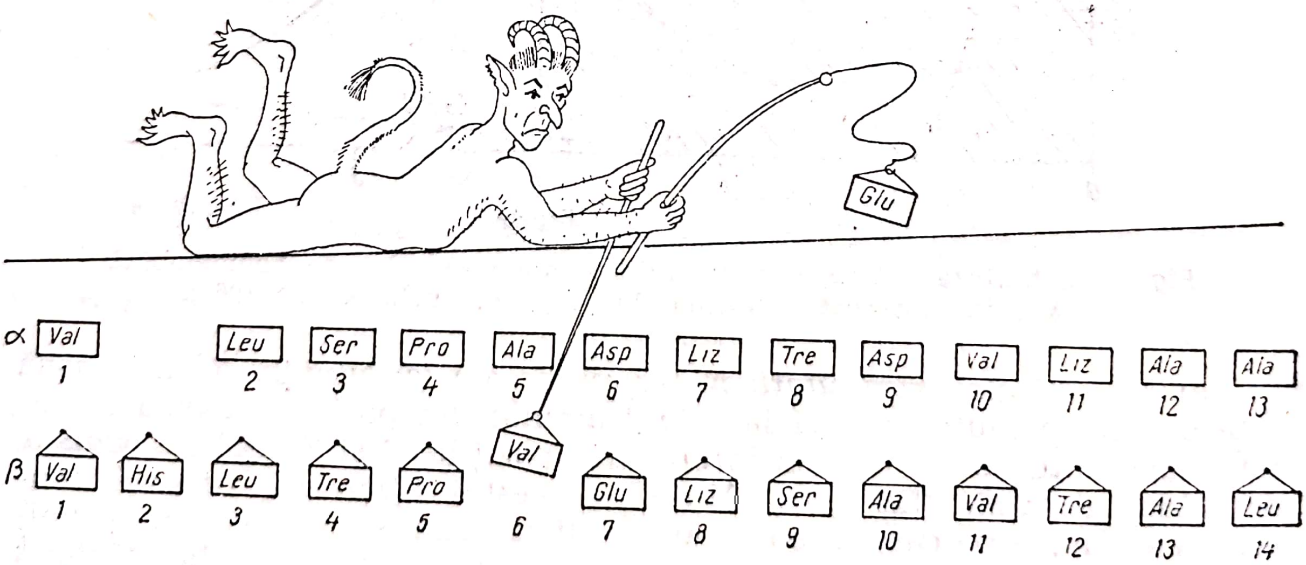


Fig. 5-18. Ilustrare umoristică a caracterului nociv al substituirii unui acid amina în lanţurile globinei (după L. Heilmeyer, 1968) (142).

Spre deosebire de siclemie, unde apariţia eritrocitelor în formă de seceră sau de spice bătute de vînt se datoresc apariţiei de tactoizi (vezi cap. 3, pag. 200), în HbC polimerizarea moleculelor de hemoglobină are tendinţa la cristalizarea veritabilă. Acest fenomen poate fi pus în evidenţă cu ajutorul microscopului cu contrast de fază; cristalele sînt birefringente şi absorb puternic lumina în banda de 414 mμ, dimensiunile lor sînt variabile, iar forma lor este tetragonală. Această organizare supracuaternară (pentenară), explică creşterea vîscozităţii eritrocitare cu diminuarea rezistenţei mecanice, în timp ce rezistenţa osmotică rămîne nemodificată. Aici nu apar corpi Heinz, însă microcristalele joacă, probabil, un rol analog cu al corpilor Heinz, facilizînd fragmentarea eritrocitară cu sechestrare şi fagocitare crescută la nivelul splinei. Pentru aceasta pledează şi reducerea duratei de viaţă a eritrocitelor şi creşterea după splenectomie a numărului de eritrocite cu astfel de cristale (83).

b) *Hemoglobine instabile* (181, 303, 341). Structura moleculei de Hb prezintă cîteva puncte care fac ca suspensia ei în lichidul intraeritrocitar să fie labilă şi favorizează precipitarea ei sub formă de polimeri globulari (corpi Heinz) (vezi cap. 3, pag. 210). Apariţia lor scurtează durata de viaţă a eritrocitelor, determinînd o anemie hemolitică şi excreţie urinară de compuşi dipirolici în urină. Aceste hemoglobine pot avea, adeseori, o migrare electroforetică normală; în aceste cazuri, detectarea lor se face prin expunere la o temperatură uşor crescută (50°C), la care precipită sub formă de conglomerate heterogene de corpi Heinz (vezi „Labilitatea termică", pag. 324). Acest test este probabil cel mai simplu şi mai sensibil din toate testele „screening" de depistare a hemoglobinopatiilor. Unele din hemoglobinele instabile au o susceptibilitate crescută faţă de O_2, ducînd la creşterea concentraţiei de methemoglobină în sînge (Hb Köln, Freiburg etc.), altele au această afinitate mai scăzută (Hb Hammersmith); numeroase Hb instabile nu prezintă modificări în legătură cu afinitatea globinei faţă de O_2. Hb instabile localizate pe lanţul β fac ca lanţurile α să se elibereze uşor din tetramer; astfel separate ele migrează mai lent chiar decît HbA_2.

Substituirile de acizi aminaţi afectează, fie legarea hemului de globină (care se desprinde uşor de pe catene, de ex.Hb.Zurich, Hb.Hammersmith, Hb.Bucureşti), fie legăturile intercatenare (Hb.Philly, Hb.Tacoma etc.), fie configuraţia spaţială a tetramerului (Hb.Genova, Hb.Freiburg, Hb.Gun Hill etc.).

Se cunosc circa 25 de tipuri de mutaţii care duc la Hb instabile, din care circa 20 sînt localizate pe lanţul β (vezi tabelul 7-3).

Hb Zürich a fost descoperită la un bolnav care prezenta accese hemolitice acute declanşate de ingestia de sulfamide. În formele heterozigote, Hb instabilă se găseşte în proporţie de 25%; nu s-au descris forme homozigote. Este interesant de menţionat că substituirea histidinei din poziţia 63 a lanţului β, de care se leagă atomul de fier al hemului, are loc, ca şi în Hb M Saskatoon (vezi Hb M), dar spre deosebire de aceasta, în Hb Zürich, înlocuirea ei se face prin tirozină şi nu prin arginină; această diferenţă face ca, clinic, în Hb M Saskatoon să predomine cianoza, iar în Hb Zürich — crizele hemolitice. Se presupune că reziduul voluminos al argininei, care nu se poate aşeza normal în scobitura hemu-

lui, dezorganizează segmentul helicoidal E și facilitează accesul agenților oxidanți la cisteine (83).

Hemoglobina Ube 1 a fost descoperită în Japonia la un bolnav suferind de o anemie hemolitică importantă cu prezența în număr mare a corpilor Heinz; splenectomia a ameliorat starea clinică a bolnavului. Anomalia rezultă dintr-un blocaj al reactivității grupării-SH a cisteinei situate în poziția 93 a lanțului.

Hemoglobina Köln rezultă din înlocuirea valinei în poziția 98 a lanțului β cu metionina; aceasta face ca în tetramerul de hemoglobină să nu se poată fixa două din cele patru grupări de hem, ceea ce explică tulburările în fixarea oxigenului și tendința la disociere moleculară (280).

Hb Torino și Hb Hammersmith sînt două hemoglobine instabile în care fenilalanina (din poziția 43 a lanțului α pentru prima și din poziția 42 pentru a doua) este înlocuită cu valina; acest fapt are ca urmare afectarea stabilității hemului. În mod normal, fenilalaninele vin în contact cu hemul prin doi atomi de carbon ai radicalului de acid benzoic. Înlocuirea lor cu valina (care are un radical lateral mult mai scurt) accentuează „adîncitura" în care este plasat hemul permițînd pătrunderea apei și provocînd o instabilitate a moleculei de hemoglobină cu apariția de corpi Heinz și hemoliză.

Hb Viena este o formă de hemoglobină instabilă în care tirozina din poziția 130 a lanțului β este înlocuită cu acidul aspartic, încît un acid aminat apolar (care privește spre interiorul moleculei) este înlocuit cu un acid aminat polar.

Hb Genova este o hemoglobinoză în care leucina din poziția 26 a lanțului β este înlocuită cu prolina. Se știe că prolina este un acid aminat care permite întreruperi de la structura în spirală (α helix), fiind prezent în toate locurile unde segmentele polipeptidice formează bucle. Înlocuirea leucinei cu prolina duce la „destabilizarea" segmentului B a lanțului polipeptidic și astfel la instabilitatea globală a moleculei de Hb.

Hb Kansas este o hemoglobină în care anomalia constă din înlocuirea treoninei din poziția β-104 cu aspargina. Acest acid aminat, situat în fundul lojei hemului, fixează hemul prin grupările vinil. Mutația duce la tulburare de fixare a hemului și la instabilitate moleculară prin perturbarea contactelor α_1—β_2 cu tendință la disociere în dimeri (tulburare a cooperării între catene). În plus, această anomalie manifestă o afinitate scăzută față de oxigen și tendință la methemoglobinizare.

Hb București este o hemoglobină instabilă, în care fenilalanina din poziția 42 a lanțului β este înlocuită cu leucina. Deși electroforeza hemoglobinei este normală, se pun în evidență corpi Heinz în cantitate crescută, iar testul de stabilitate termică este pozitiv (54).

c) *Mutații methemoglobinizante (cianozante).* Aceste hemoglobinopatii heterogene (Hb M) formează o categorie aparte prin faptul că sînt methemoglobinizante (mențin fierul în stare ferică, trivalentă, incapabil de a efectua legături labile cu O_2). Mutația nu duce la fragilitatea eritrocitelor, dar provoacă cianoza. Ele se cunosc numai în formele heterozigote, în care concentrația MetHb eritrocitare variază între 15 și 30% (normal 1%). Deși nu se cunosc forme homozigote, se poate deduce că existența lor ar fi incompatibilă cu viața.

În hemoglobinopatiile M este înlocuit un acid aminat bazic, histidina (prin intermediul căruia fierul heminic se leagă în ax perpendicular de gruparea prostetică) printr-un acid aminat cu o funcție acidă (tirozina) (fig. 5-19). Din această substituire legăturile fierului cu globina devin mai puternice și deci greu reversibile, astfel încît fierul nu mai poate lua parte la transportul de O_2. Devenit trivalent, prin însăși construcția defectuoasă a moleculei de hemoglobină, fierul nu mai poate fi redus de către enzimele eritrocitare (methemoglobin reductaza și altele), cu toate că sistemele reductoare funcționează normal (163).

Scanned with OKEN Scanner

Prin înlocuirea histidinelor distale ale celor două lanțuri se produce blocarea accesului de oxigen la fier, atît din cauza inelului aromatic al tirozinei care este mai mare, dar mai ales din cauza stabilirii unei legături de hidrogen între —OH fenolic al tirozinei cu fierul, ceea ce favorizează formarea de Fe^{+++}, de unde inaptitudinea lanțului anormal de a mai contracta legături reversibile cu oxigenul. Prin pierderea legăturii fierului cu histidina normală înlocuită, acestea se leagă covalent de histidina distală; gruparea —OH fenolică a tirozinei introduse contractează legături ionice cu hemul.

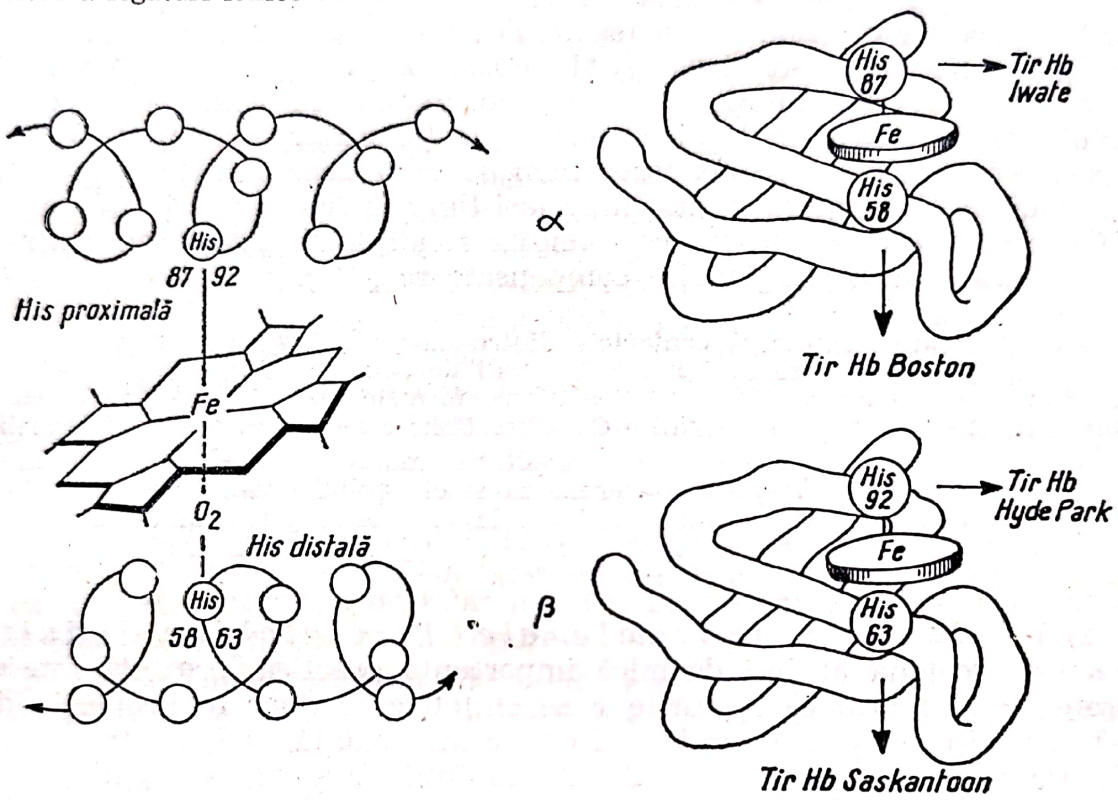


Fig. 5-19. Localizarea „leziunilor" moleculare în methemoglobinemie (modificat după S. Shabata).

În stînga, structura centrului bazic al oxihemoglobinei; este figurată legarea fierului (direct) de histidina proximală (poziția 87 pentru lanțul α și 92 pentru β) și (prin intermediul oxigenului) de histidina distală (poziția 58 pentru lanțul α și 63 pentru β) *În dreapta,* reprezentarea structurii tridimensionale a lanțurilor respective de hemoglobină.

Din compararea comportării hemoglobinelor M cu localizare pe lanțul α și a celor cu localizare pe lanțul β reies anumite deosebiri. Hb M cu localizare pe catenă α (ex. Hb M Iwate) prezintă importante anomalii spectrale și o afinitate scăzută pentru oxigen, în timp ce Hb M cu localizare pe lanțul β nu prezintă decît anomalii spectrale neînsemnate și o afinitate crescută pentru oxigen (curbă de tip mioglobinic). Perutz a căutat să explice această comportare prin diferențele de cooperare a lanțurilor acestor subunități (α și β) cu oxigenul (83, 240).

Tot în sens methemoglobinizant acționează și înlocuirea valinei din poziția 67 a lanțului cu acidul glutamic (Hb Milwankee). Gruparea —COOH a acidului glutamic (monoamino-diacid) înlocuind un acid aminat apolar (valina) ar juca un rol asemănător cu al tirozinei; la aceasta contribuie structura în α helix a segmentului de lanț din această zonă. Se știe că într-o răsucire completă a lanțului polipeptidic intră 3,6 acizi aminați; în consecință histidina de la poziția 63 ajunge alături de acidul glutamic din poziția 67 care fiind polar o împiedică să stabilească legături coordinative cu fierul. Reiese din aceste exemple că tulburarea funcției respiratorii a hemoglobinei depinde și de direcția în care este orientat acidul ami-

nat în spirală. Acest lucru poate fi demonstrat și mai bine prin următorul exemplu: în Hb Norfolk glicina din poziția 57 a lanțului α (deci în vecinătatea imediată a histidinei 58) este înlocuită cu acidul aspartic (tot monoamino-diacid, ca și acidul glutamic) fără ca funcția acestei hemoglobine să fie modificată din cauză că acidul aminat substituit este orientat în direcția contrară fierului (115).

Spectroscopic, Hb M prezintă un vîrf la 630 mμ și o depresiune la 60 mμ.

d) *Hemoglobine generatoare de poliglobulie.* În aceste hemoglobinopatii se produce o schimbare a legăturilor normale dintre lanțurile polipeptidice perechi (α—α și β—β) și neperechi (α_1—β_2 și α_2—β_1). Alterarea cooperării subunităților hemoglobinice duce la schimbarea echilibrului, atît în cadrul moleculelor globinice (tetramer, dimer, monomer), cît și al cooperării lor cu gruparea hem. Aceasta face ca molecula să fie mai avidă de O_2 în pulmon, dar în același timp să fie mai puțin „darnică" cu O_2 față de țesuturi, producînd o anoxie relativă cu stimularea secreției de eritropoietină și poliglobulie compensatoare (341).

Mutațiile care interesează contactele dintre monomerii α_1 și β_2 sînt cele mai numeroase; între aceștia se interpun 19 radicali de acizi aminați; contactele anormale dintre aceștia alterează stabilitatea dintre formele oxi- și dezoxi- ale hemoglobinei, cu alterarea afinității față de O_2 (efect Bohr crescut), ca în Hb Chespeake.

Mutațiile care interesează contactele dintre monomeri (de exemplu dintre catenele β—β ca în Hb Hiroshima) generează și ele poliglobulie, însă aici efectul Bohr este scăzut. Această mutație avînd loc la capătul C terminal al lanțului β (poz. 143) se produce un dezechilibru între —COOH terminal al tirozinei și histidină, care este înlocuită cu acidul aspartic (341).

2) *Variantele anormale ale hemoglobinei adulte minore* (catena δ) deși de mică importanță practică, prezintă interes teoretic. Prin faptul că lanțurile δ se sintetizează doar în proporție de 1—3%, modificarea structurală, ori cît de importantă ar fi pentru moleculă, rămîne fără efect clinic. Aceste mutații ar putea prezenta unele manifestări mai evidente în cazurile de talasemie cu creștere compensatorie de Hb A_2. Mutațiile apărute pe lanțurile δ nu pot fi descoperite decît dacă se fac investigații active la un număr mare de indivizi sănătoși. Cum deosebirile între lanțul β și δ constau numai în 10 acizi aminați, numărul de mutații diferite ale lanțului δ nu poate fi prea mare. Pentru a le deosebi de Hb A_2 (normală) unii autori folosesc, pentru Hb anormale, rezultate din mutațiile de lanțul β, simbolul Hb B_2.

3) *Variante anormale ale hemoglobinelor fetale și embrionare.* Se știe că Hb F, care formează la naștere 60—80% din hemoglobina totală, scade rapid încît, după vîrsta de un an nu mai persistă decît în cantități neînsemnate. Hemoglobina embrionară restantă este și ea aproape complet eliminată după primele săptămîni de viață intrauterină. Prezența anomaliilor pe aceste lanțuri poate avea repercusiuni importante asupra dezvoltării intrauterine a organismelor. Unele din mutațiile apărute pe lanțurile ε sau γ, precum și pe lanțurile α sînt incompatibile cu dezvoltarea la termen, ducînd la avorturi precoce, nașteri premature cu făt mort, sau la distrofii ale nou-născutului. În cazul în care nașterea s-a produs normal, tulburarea poate dispare o dată cu suspendarea sintezei acestor lanțuri; ele pot persista numai dacă defectul

Scanned with OKEN Scanner

este situat pe lanțurile α care sînt prezente în toate hemoglobinele, de la etapa de embrion, pînă la sfîrșitul vieții.

Mutațiile cu consecințe biologice, ce aparțin Hb F sau celor primitive, pot fi descoperite prin cercetarea sîngelui la embrionul avortat sau la fătul neviabil, precum și la copiii cu anomalii ereditare. Cele fără consecințe clinice pot fi descoperite și ele întîmplător, sau dacă se fac cercetări în masă pe sîngele recoltat din cordonul ombilical. Modificări clinice evidente ar putea apare și la adult în cazurile de persistență a hemoglobinei fetale, însă numai dacă tipul de Hb F mutant este de natură să tulbure funcția sau echilibrul structural al moleculei.

b. **Mutații ale genelor reglatoare.** În aceste boli lanțurile care alcătuiesc complexele moleculei de hemoglobină ($\alpha_2\beta_2$, $\alpha_2\gamma_2$, $\alpha_2\delta_2$ și tetramerele lor) sînt structural normale; anomalia constă în tulburări ale proporției în care se sintetizează aceste lanțuri pereche (anomalii cantitative sau dezechilibrate); deficitul care rezultă din sinteza scăzută a unui lanț din pereche (ca urmare a unui blocaj genic) se compensează uneori prin sinteza în cantitate mai mare a unui alt tip de lanț (normal) rezultînd o creștere cantitativă a unei hemoglobine „minore". Aceste anomalii heterogene sînt cuprinse în termenul de *sindrom talasemic**. Răspîndirea lor pe glob este foarte mare, depășind chiar pe aceea a siclemiei. Ele se traduc clinic prin semne asemănătoare hemoglobinopatiilor, cu modificări organice (infantilism somato-psihic, splenomegalie, anemie hipocromă, semne de hemoliză etc.). În funcție de tipul de lanț globinic afectat există patru varietăți de talasemie (α, β, γ și δ), precum și varietăți duble (βδ talasemie) (vezi Hb Lepore).

În bazinul mediteranean (de asemenea și în țara noastră) cel mai important tip de talasemie este cel caracterizat prin scăderea sintezei lanțului β.

1) *Hemoglobine tetramere omologe*

a) *Hemoglobine formate din tetrameri* α. Lanțurile α au o slabă afinitate între ele încît este îndoielnică posibilitatea existenței unei Hb α_4. Unii autori au semnalat totuși, într-o proporție redusă, astfel de tetrameri, atît în hemoglobinele normale (A_1), cît și în unele Hb patologice (Hb G). Punerea lor în evidență este dificilă, între altele, din cauza instabilităților acestui tip de tetramer în cursul manipulărilor tehnice.

b) *Hemoglobine formate din tetrameri non* α. Au fost descrise 3 hemoglobine fără lanțuri corespunzătoare hemoglobinelor normale (A, F și A_2), formate din tetrameri patologici din lanțurile non α ale acestora.

— *Hb H* (β^A) este un tetramer relativ frecvent întîlnit în zone geografice diferite (Asia de sud-est, Africa, Bazinul mediteranean) (137). Această anomalie apare în cazul sintezei deficitare de lanțuri α (α talasemie). În formele homozigote descrise (cu Hb H între 30 și 100%) fătul este neviabil prezentînd anasarcă feto-placentară, drepanocite în sîngele periferic, corpi Heinz. O particularitate a acestei hemoglobinoze este existența unei curbe hiperbolice de disociere a hemoglobinei, asemănă-

* Cuv. gr. *Thalassa*=mare (cu referire la bazinul mediteranean)

Scanned with OKEN Scanner

toare cu aceea a mioglobinei (comportament monomeric, deşi este un tetramer omolog).

Formele heterozigote se întîlnesc relativ frecvent, afecţiunea fiind bine suportată, chiar la adulţi, dacă proporţia de Hb H este redusă.

Au fost descrise şi Hb H care, în afară de mutaţia genelor de aranjament, prezentau şi mutaţii ale genelor de structură, astfel Hb Augusta 1 (β_4^S) şi Augusta 2 (β_4^C).

— *Hb Bart's* (γ_4) este omologul fetal al Hb H. Sîngele cordonului ombilical conţine la nou-născuţi 1—1,5% din acest tetramer; prezenţa unor cantităţi mai mari pledează pentru o α-talasemie, deşi poate fi întîlnită uneori şi în β-talasemii totale (blocare completă a sintezei catenelor β). Această hemoglobină se comportă asemănător cu omologul ei adult (Hb β_4), fiind caracterizată printr-o curbă de disociere a O_2 în formă hiperbolică, absenţa efectului Bohr, tendinţa crescută la transformare în Methb.

— *Tetramerul* δ, a fost descris de Dance şi colab. în 1963.

— *Tetramerul* ε sau Gower 1 este hemoglobina normală a primei perioade de dezvoltare embrionară.

2) *Tulburări heterogene de aranjament molecular.*

a) *Talasemiile* α. Acest grup de anomalii se caracterizează prin diminuarea sintezei lanţurilor α, care poate merge, în unele forme homozigote, pînă la sistarea ei totală. Se ştie că în cursul evoluţiei ontogenetice lanţul α este constant prezent, fiind dublat succesiv de diferite lanţuri non α (ε, γ, β şi δ). Limitarea sintezei lanţurilor α duce deci la scăderea producţiei, nu numai a Hb A_1, ci şi a celorlalte forme de hemoglobină (Hb F, Hb A_2), toate fiind deţinătoare de lanţuri α.

Patologia α-talasemiilor se suprapune, în mare parte, patologiei talasemiilor cu tetrameri omologi descrişi mai sus (în afara tetramerilor α). Formele homozigote ale α-talasemiilor sînt letale; formele heterozigote prezintă în afară de constatarea tetramerilor (mai ales β_4), o scădere globală a cantităţii de hemoglobină, fără modificarea proporţiilor dintre cele trei varietăţi de hemoglobine normale.

b) *Talasemiile* β se caracterizează prin diminuarea (uneori pînă aproape de dispariţie) a lanţurilor β; lanţurile α îşi găsesc parteneri în lanţurile δ şi γ. Aceasta duce la apariţia hemoglobinei F (la adult) şi la creşterea Hb A_2. Astfel în formele heterozigote hemoglobina minoră (A_2) se ridică de la 2—3%, la dublu (4—6%) şi rareori la triplul valorilor normale (8%), trăsătură ce caracterizează această formă, pe cînd creşterea Hb F este mai puţin „normată" concentraţia ei fiind foarte variabilă (0,5—6%). Se pare că se poate accepta regula că între creşterea Hb F şi nivelul Hb A_2 există o relaţie inversă. În formele homozigote se întîmplă un fapt întrucîtva surprinzător: Hb F reprezintă 30—90% din totalul hemoglobinei, pe cînd Hb A_2 nu apare crescută compensator ca în forma heterozigotă. Chiar şi prezenţa de Hb A_1 în formele homozigote de talasemie β (10—70%) demonstrează că inhibarea sintezei lanţurilor β poate fi de grade diferite, fără să se ajungă la o blocare totală. Formele cu Hb F într-o proporţie de 98—100% sînt excepţionale.

Scanned with OKEN Scanner

Fessas și colab. (1965) au arătat că în formele homozigote de talasemie β se pot pune în evidență tetrameri sub forma corpusculilor intraeritrocitari care sînt, probabil, lanțuri α legate de ribozomi, deoarece pentru detașarea lor de pe polizomi este necesară prezența lanțurilor β și δ. Aceste complexe de tetrameri α și ribozomii lor dau conglomerate de corpi Heinz de un tip special, frecvente în acest tip de talasemie.

Este de menționat că în talasemie creșterea Hb F (iar în α talasemie formarea tetramerilor γ_4) nu este egal distribuită în toate eritrocitele: unele conțin cantități crescute sau aproape exclusive de astfel de combinații, pe cînd altele conțin cantități mai mici sau sînt lipsite de Hb F sau de Hb Bart's. Distribuția inegală a Hb F (alături de alte cîteva particularități), deosebește β talasemia de sindromul persistenței ereditare a Hb F.

c) *Talasemia* δ. Scăderea Hb A_2 la circa 1,2% la heterozigoți și la 0 la homozigoți, a fost interpretată ca δ-talasemie. Aceste forme nu dau nici o tulburare clinică sau modificare sanguină, dar sînt interesante din punct de vedere teoretic.

d) *Talasemiile mixte* (βδ talasemii și αβ talasemii). Au fost descrise cazuri în care inhibiția de sinteză interesează mai multe lanțuri globinice. Scăderea considerabilă a lanțurilor β și δ a fost numită β-talasemie tip II sau βδ talasemie. Forma mixtă de α și β talasemie ar duce la refacerea balanței în dezechilibrul celor două tipuri de lanțuri.

e) *Persistența ereditară a hemoglobinei fetale* se caracterizează prin continuarea sintezei Hb F în perioada adultă. În formele heterozigote aceasta se sintetizează în proporție de 15—20%, iar în cele homozigote, proporția ei se poate ridica la 100%, organismul neputînd produce decît hemoglobină fetală. Mecanismul genetic al acestei stări nu este clar; se pare că genele β și δ, apropiate ca structură de gena γ, nu pot să-și ia înainte de naștere „demarajul", astfel că gena γ rămîne gena funcțională în tot decursul vieții.

Frecvența acestei anomalii este de circa 0,1% la negrii din America și din Africa de vest. Au fost descrise mai multe forme heterozigote de persistență ereditară a Hb F, forme „negre", în care Hb F oscilează între 15 și 38% (în medie 26%), forma „greacă" cu 10—19% (în medie 15%), forma „Giorgia" cu 4—5% Hb F și forma „elvețiană" cu 1—3% Hb F (întîlnită într-o proporție de 1% la populația din sudul Elveției).

Sinteza Hb F poate fi întîlnită într-o proporție de 5—10% și în numeroase stări patologice dobîndite ca boală Biermer, leucemii acute și chiar în stări fiziologice (sarcină). În aceste situații, evident, această anomalie nu se constată la părinți.

3) *Hemoglobine cu lanțuri hibride* (Hb tip Lepore). Prima hemoglobină de acest tip a fost descrisă în 1958 de Gerald și Diamond într-o familie de emigranți italieni în SUA, anomalia fiind numită Lepore, după numele acestei familii. Descrierea ei a stîrnit un interes deosebit întrucît unul din lanțurile globinice pare a fi rezultat din „monozaicarea" a două lanțuri globinice diferite printr-un crossing over inegal neomolog, în urma căruia un fragment din gena β a fuzionat de la „cap

Scanned with OKEN Scanner

la coadă" cu porțiunea consecutivă a lui din gena γ, lungimea fiind egală cu aceea a lanțului β sau γ (146 resturi de acizi aminați).

De la acea dată au fost descrise mai multe variante de Hb Lepore: variantele Boston și Pilos, varianta Hollandia și Baltimore etc. (vezi tabelul 5-3, pag. 304). Au fost constatate chiar și forme homozigote, în care nivelul ei varia între 8,6 și 27%. Clinic aceste forme se aseamănă ca severitate cu talasemia majoră; în sîngele acestor bolnavi nu se constată nici Hb A_1, nici Hb A_2 singura hemoglobină fiind Hb F (272, 341).

3. GENETICA BIOSINTEZEI GLOBINELOR

Ca orice proteină, componentele proteice ale hemoglobinelor se sintetizează după „modelul" înscris în nucleul celular, respectiv în genele corespunzătoare, segmente ale lanțului de ADN (fig. 5-20). Sinteza propriu-zisă are loc în citoplasmă la nivelul polizomilor, unde informația adusă de ARN mesajer este „descifrată" de ARN de transfer pe baza codului genetic și „transcrisă" în secvența de acizi aminați. Spre deosebire de aceasta, componenta neproteică, hemul, nu se sintetizează pe baza unei informații genetice directe (nefiind o proteină); formarea lui are loc din diverse substanțe simple aflate în citoplasmă, urmînd o succesiune de reacții enzimatice, enzimele respective (în calitate de proteine) fiind sintetizate însă pe bază de informație genetică directă (fig. 5-21). În sinteza hemului un rol important îl au unele organite citoplasmatice, în primul rînd mitocondriile (22, 115, 117, 196, 211, 243, 273, 281).

a. **Transmiterea anomaliilor genelor de structură** sau mai exact operonii care reprezintă unități funcționale, uneori plurigenice (vezi. fig. 1-35) furnizează ribozomilor informația necesară elaborării tipurilor de lanțuri polipeptidice (α, β, γ și δ), pentru fiecare existînd cîte un operon diferit (228). Genele de structură există în „dublu exemplar", cîte una pe fiecare din cromozomii omologi. Se presupune că gena este situată pe altă pereche de cromozomi decît grupul genelor β, γ și δ, dar pînă în prezent nu se știe care sînt acești cromozomi (probabil perechile 13 și 15). Operonii între ei pot fi în relații identice sau diferite. În mod normal, genele care guvernează sinteza lanțurilor α și β, deși independente, situate la distanță, sînt în relații identice.

Organismul uman fiind diploid, sinteza fiecărei proteine este determinată de cîte două gene situate pe locusuri identice ale cromozomilor omologi moșteniți cîte unul de la fiecare părinte (fig. 5-22).

Genele alterate mutațional sînt forme alelice ale genelor normale. de exemplu gena βS este și alelă mutant a genei βA. Dacă individul este heterozigot pentru o anumită tară, posedă o singură genă patologică, perechea ei fiind normală; în această situație (în cazul unei hemoglobinopatii), el formează două varietăți din lanțul globinic afectat; una patologică și alta normală. Genotipul heterozigot pentru hemoglobină se notează după următoarea formulă: αAβA/αAβS (în care s-a luat ca exemplu siclemia) (fig. 5-23).

Dacă individul este un homozigot pentru o tară, pe ambele locusuri există alele mutant, identice. lanțul globinic interesat fiind de un singur

Scanned with OKEN Scanner

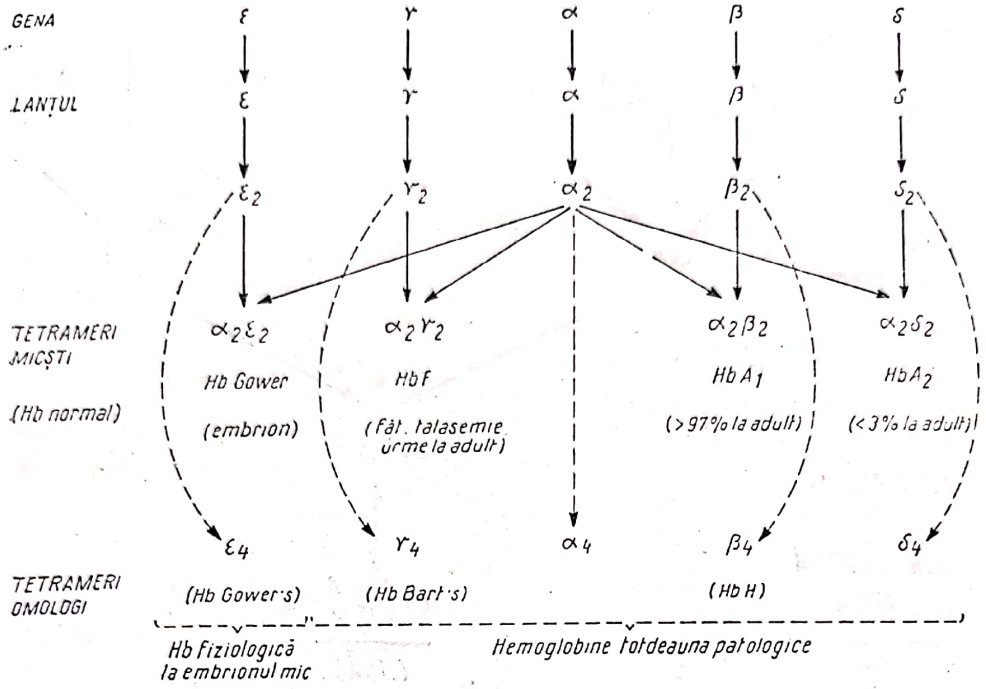


Fig. 5-20. Schema hemoglobinosintezei (modificat după A. Orsini, 1973).

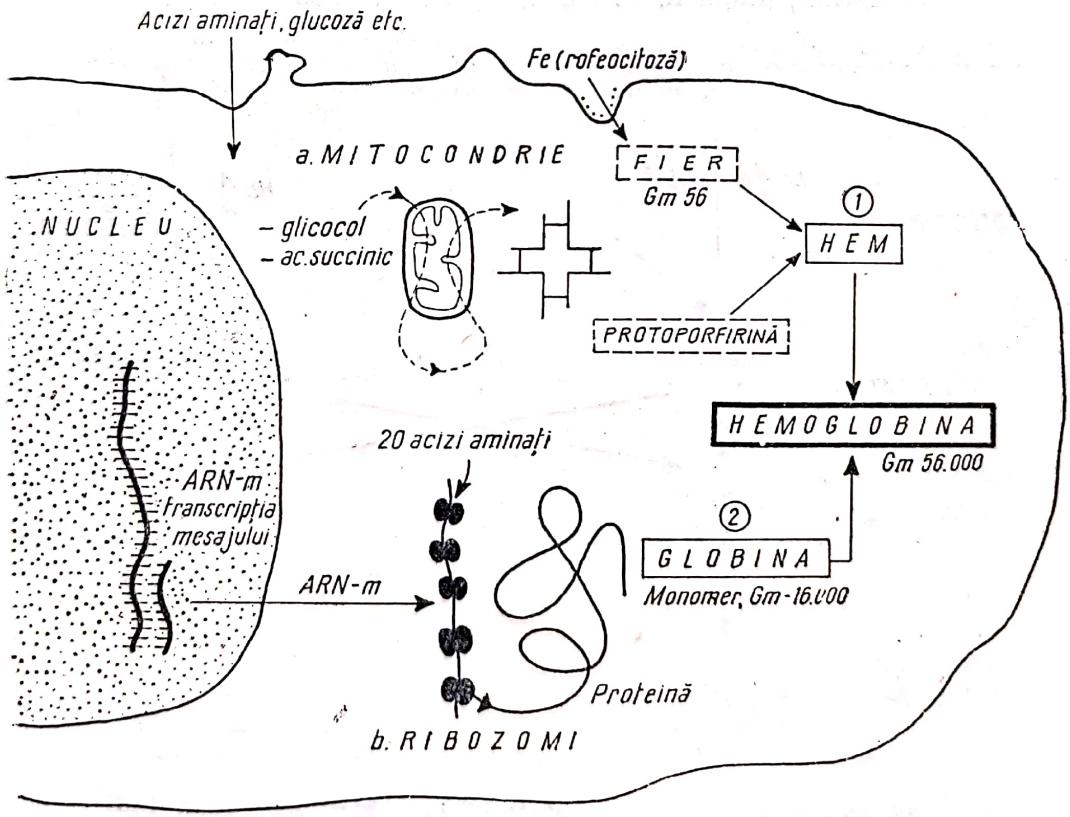


Fig. 5-21. Schema sintezei heteroproteinei de hemoglobină în citoplasma eritroblaștilor.

Hemul nu are determinanți genetici direcți, sinteza lui făcîndu-se „postribozomial" de către un complex de enzime, iar enzimele eritrocitare nu sînt în măsură să fabrice proteine. Lanțurile polipeptidice de globină sînt sintetizate pe baza matrițelor codului genetic înscris în nucleul eritroblaștilor.

Scanned with OKEN Scanner

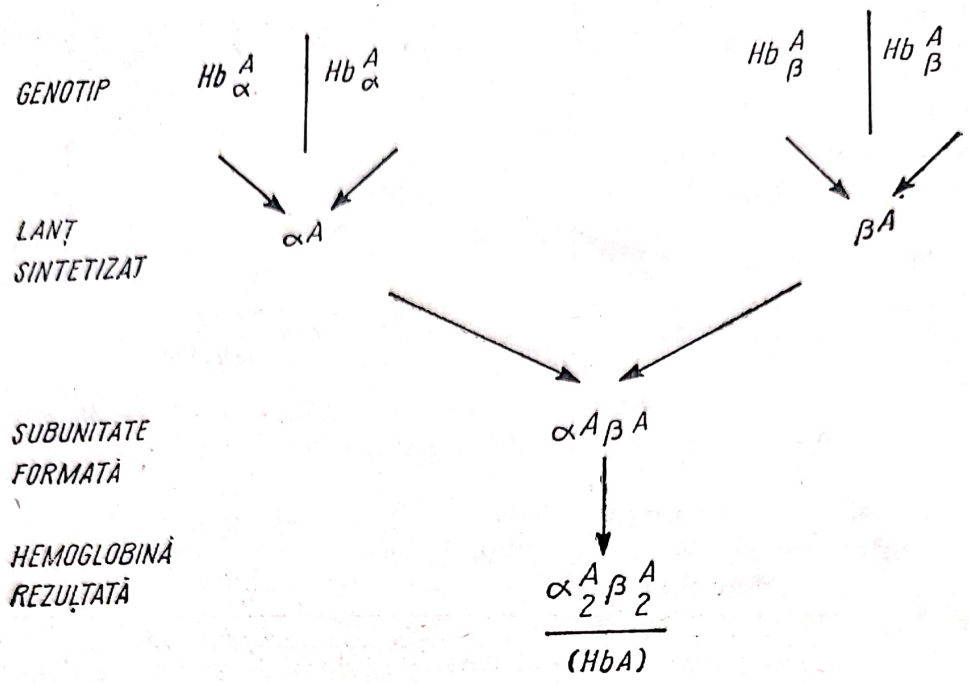


Fig. 5-22. Controlul genetic al sintezei hemoglobinei A la un individ normal (după E. R. Huehns și E. M. Shooter, 1965).

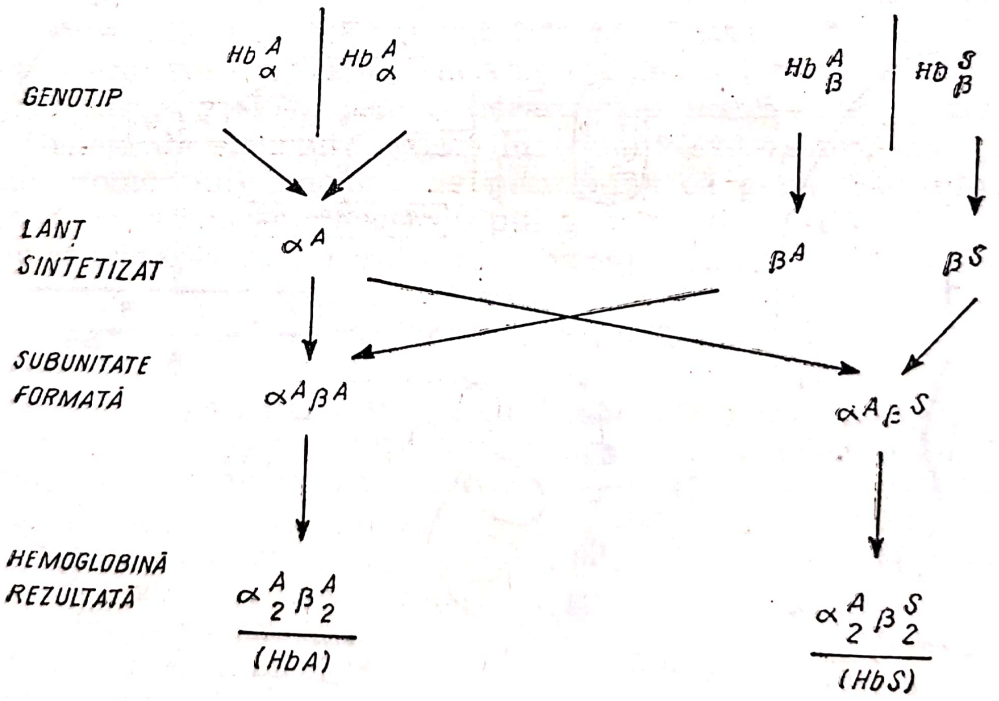


Fig. 5-23. Controlul genetic al sintezei hemoglobinei la un individ purtător al unei tare drepanocitare (după E. R. Huehns și E. M. Shooter, 1965).

Indivizii care moștenesc o singură genă anormală, cu afectare, fie a lanțului », fie a lanțului , sintetizează două hemoglobine diferite, una normală și alta patologică, în exemplul dat Hb A și Hb S.

Scanned with OKEN Scanner

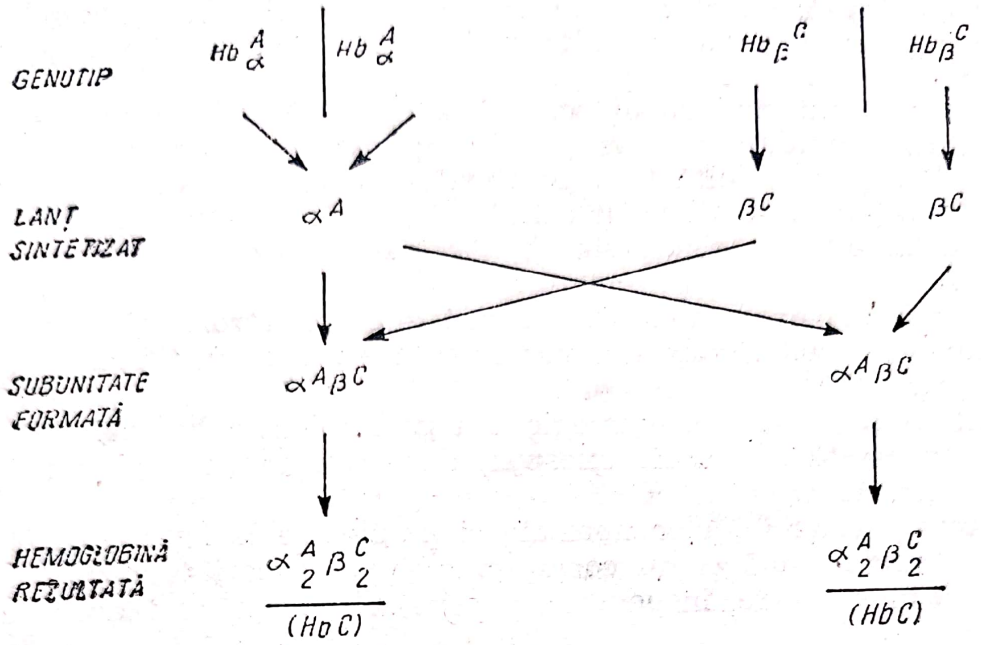


Fig. 5-24. Controlul genetic al sintezei hemoglobinei la un purtător homozigot de hemoglobină C (după E. R. Huehns și E. M. Shooter, 1965).

La acești indivizi se sintetizează numai lanțuri α A și β C, din combinarea cărora se formează un singur tip de hemoglobină; toți descendenții sînt purtători heterozigoți ai tarei de Hb C.

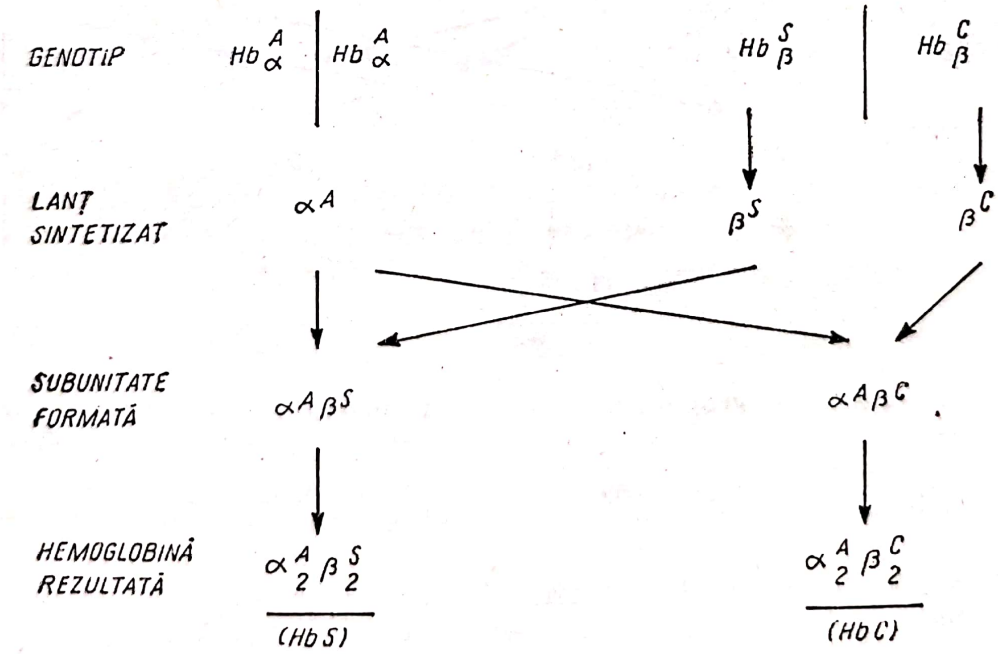


Fig. 5-25. Controlul genetic al sintezei hemoglobinei la un individ dublu heterozigot de pe același lanț polipeptidic.

Se sintetizează 3 tipuri de lanțuri polipeptidice: α A, β S, C, din care rezultă 2 varietăți de hemoglobină, ambele patologice.

Scanned with OKEN Scanner

tip (cel patologic); astfel, în cazul hemoglobinopatiei C, genotipul homozigot se reprezintă după formula: αAβC/αAβC (cu ambele lanțuri patologice) (fig. 5-24).

Există situații cînd două locusuri omologe sînt, fiecare în parte, sediul cîte unei mutații diferite (de exemplu, una din genele β, purtînd tara de Hb S, iar cealaltă tara de Hb C), realizînd starea de heterozigotism dublu. Descendenții unui astfel de individ (cu un părinte normal) vor fi cu toții heterozigoți simpli, fie pentru Hb S, fie pentru Hb C (fig. 5-25).

În cazul în care ambii părinți sînt dublu heterozigoți, pentru gene sintetizate pe locusuri diferite, vor rezulta 4 varietăți diferite de hemoglobină (fig. 5-26).

Cantitativ, sinteza de hemoglobină patologică la homozigoți este, în general, apropiată (cu unele excepții) de aceea a hemoglobinei normale corespunzătoare.

Sinteza hemoglobinelor normale și patologice la heterozigoții simpli este cantitativ inegală și nu corespunde decît rareori proporțiilor așteptate. Alela mutant are, în general, o penetranță mai mică decît cea nor-

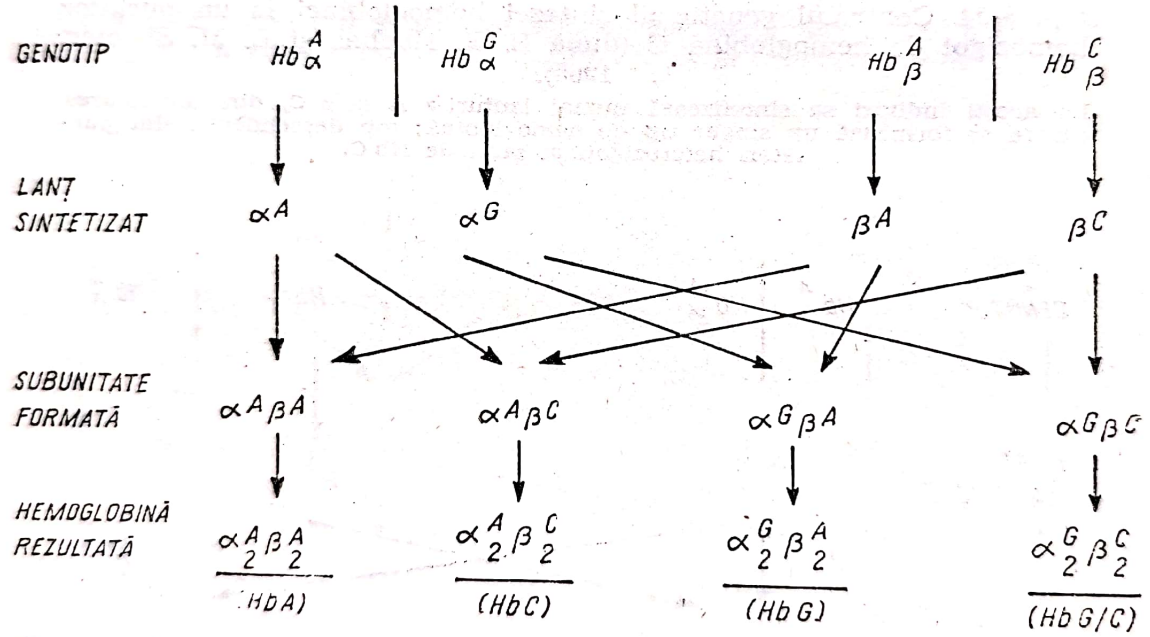


Fig. 5-26. Controlul genetic al sintezei hemoglobinei la un individ dublu heterozigot cu localizarea tarei pe lanțuri diferite (după E. R. Huehns și E. M. Shooter, 1965).

Cînd există două mutații patologice, una pe o genă α și alta pe o genă β, se sintetizează 4 varietăți de hemoglobină, în exemplul dat Hb A, Hb C, Hb G și Hb G-C.

mală, hemoglobinele patologice sintetizîndu-se de regulă în cantități inferioare hemoglobinelor normale. Raportul între cantitățile de Hb normală și Hb patologică la cîteva din cele mai importante hemoglobinopatii este următorul: Hb S: 2,3/1,3; Hb C: 2,9/1,4; Hb E 1,8/1 (Boyer și colab., 1964). Cauza exactă a acestor diferențe nu se cunoaște încă. Ca o excepție se semnalează situația inversă din dublul heterozigotism tala-

semic HbS unde gena talasemică inhibă mai mult sinteza lanțurilor β normale decît a celor βS.

b. **Transmiterea anomaliilor genelor reglatoare.** Genele reglatoare (sau de control) au rolul de a regla cantitativ producția diferitelor lanțuri de globină, printr-un mecanism de represie-derepresie a genelor structurale. În timp ce ultimele se exprimă „calitativ" (defectele lor traducîndu-se prin sinteza unor lanțuri patologice), primele acționează cantitativ, asigurînd cantitatea și proporția normală a diferitelor lanțuri într-o anumită fază a ontogenezei, precum și intrarea și ieșirea din funcție a unor gene (ε, γ, β). Fenotipic, alelele lor patologice se manifestă cu caracter intermediar între dominanță și recesivitate, purtătorul heterozigot nefiind, în general anemic, deși tara este decelabilă, în timp ce purtătorul homozigot prezintă o anemie hemolitică gravă.

c. **Anomalii cantitative și calitative cîștigate ale hemoglobinei.** În diferite boli de sînge pot apare modificări în proporția fracțiunilor normale a hemoglobinelor. Este relativ frecvent întîlnită *creșterea hemoglobinei F* în unele anemii hemolitice cronice, în unele forme de leucemie acută (mieloblastică, eritroleucemii), anemia aplastică, anemie pernicioasă, siclemie și chiar în graviditate.

Hb A_2 a fost găsită crescută mai ales în anemia pernicioasă.

În anumite leucemii (eritroleucemii) s-a observat apariția Hb H (β 4), iar uneori și a Hb Bart's (γ 4).

În hemolizele acute intravasculare se găsește în plasmă și urină o Hb A din ale căror catene α lipsește arginina terminală 141 ($\alpha^{141\ Arg \rightarrow 0}, \beta_2^A$) și care a fost numită Hb Koelliker.

C. TEHNICI DE LABORATOR UTILIZATE ÎN PATOLOGIA HEMOGLOBINICĂ

Tehnicile de studiere în detaliu a hemoglobinelor comportă operații complicate. Pentru o „disecție" fizico-chimică de detaliu a structurii lanțurilor polipeptidice sînt necesare instalații speciale și personal cu înaltă calificare, condiții ce pot fi realizate numai în centre supraspecializate. În practica generală, pentru recunoașterea unei anomalii a hemoglobinei și pentru precizarea tipului de anomalie este suficientă efectuarea următoarelor tehnici, care pot fi executate și în laboratoarele cu dotare și încadrare medie: electroforeza hemoglobinei pe bloc de amidon, rezistența la alcali, testul de labilitate termică, testul de siclizare și evidențierea corpilor Heinz. În afara acestora, din ce în ce mai multe laboratoare sînt în măsură să efectueze determinarea tipului de acid aminat înlocuit, cu ajutorul tehnicii amprentelor. Alte metode, ca tehnica difracției cu raze X etc., se efectuează doar în cîteva centre de cercetare de pe glob, însă principiul e bine să fie totuși cunoscut (56, 176, 184). Concomitent cu aceste testări este necesară efectuarea anchetelor familiale; aceasta ajută diagnosticul și precizează modul de transmitere a bolilor ereditare.

Scanned with OKEN Scanner

1. TEHNICI ELECTROFORETICE

Prima hemoglobinopatie cunoscută (siclemia), care a deschis rapid calea de studiu a acestor anomalii, a fost evidențiată electroforetic (Pauling și Itano, 1949). Majoritatea hemoglobinelor anormale au sarcini electrice diferite de cele ale hemoglobinei normale, fapt care permite punerea lor în evidență cu ajutorul acestei metode. După migrarea electroforetică hemoglobinele normale și anormale se împart în lente și rapide (fig. 5—27).

Evidențierea electroforetică a anomaliilor hemoglobinice se face prin comparație cu eșantioane de sînge de la cazuri patologice cunoscute, precum și cu sînge din cordonul ombilical pentru Hb F. De aceea laboratoarele care efectuează astfel de determinări, păstrează la frigider sînge martor, împrospătat periodic; preparatul de hemoglobină se poate folosi prin păstrare la 0—4°C, timp de 2—3 săptămîni, iar la congelator (—20—30°C), timp de mai mulți ani.

Tehnicile electroforetice diferă atît după substratul folosit (hîrtie, amidon, agar etc.), cît și după pH (alcalin, neutru, acid); se folosesc numeroase combinații tehnice pentru a se obține maximum de selectivitate. De multe ori hemoglobine cu aceeași viteză de migrare pot prezenta diferențe structurale, chiar importante, care nu pot fi sesizate prin metoda electroforezei.

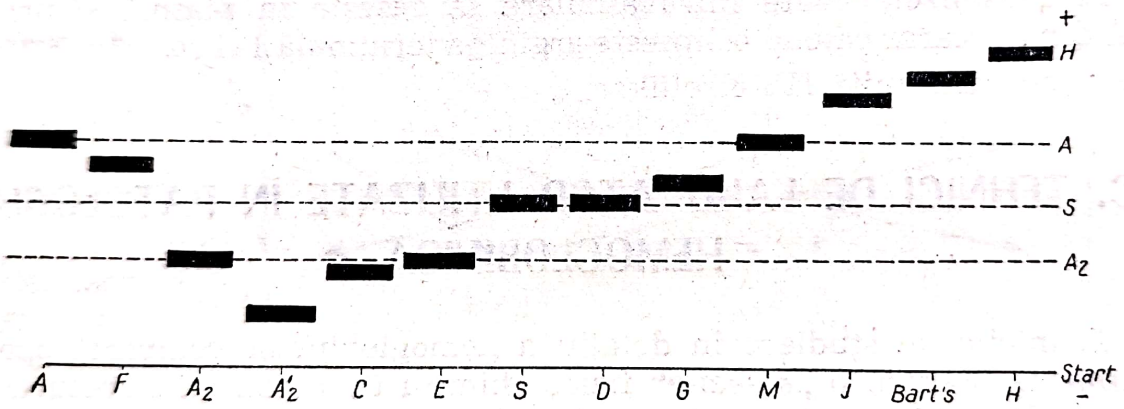


Fig. 5-27. Reprezentare schematică a migrării electroforetice a unor hemoglobine în mediu alcalin la pH 8,6 (după L. Heilmeyer, 1968).

Hb M (methemoglobinizantă), precum și unele Hb instabile (care nu sînt incluse în această figură), migrează ca și Hb A. Hb A_2 migrează aproximativ la același nivel cu Hb C și Hb E, iar Hb S cu Hb D; ultima nu dă însă siclizare. Toate acestea sînt hemoglobine patologice cu mare răspîndire. De aceea, pentru a avea certitudine, electroforeza va fi dublată de o tehnică suplimentară (rezistență la alcalii, testul de labilitate termică, testul de siclizare, colorația pentru corpi Heinz, spectrofotometrie etc.). Lucrurile se complică și mai mult cînd hemolizatul examinat provine de la heterozigoți și mai ales cînd conține mai multe variante de hemoglobină (dublu heterozigoți).

Spre deosebire de electroforeza proteinelor plasmatice, pentru electroforeza hemoglobinei, sîngele se recoltează pe un anticoagulant al cărui alegere și proporție nu este fixă. Masa eritrocitară este separată, spălată și hemolizată. După eliberarea hemoglobinei din eritrocite, aceasta este separată de stromă prin precipitare cu cloroform. După o nouă centrifugare se obține hemolizatul, care se supune electroforezei.

Scanned with OKEN Scanner

În ordinea crescîndă a vitezei de migrare hemoglobinele se succed după cum urmează:

$$C < E = A_2 < S = D < G \vee F < A \vee K < J < I = H$$

a. **Electroforeza pe hîrtie** în mediu alcalin (pH 9,2) este o metodă de orientare și selecție. Ea pune în evidență bine fracțiunile majore de Hb (de ex. Hb F în formele homozigote de talasemie). Fracțiunile minore (Hb A_2) care adesea interesează cel mai mult (de exemplu talasemia minor cu maximă răspîndire în țara noastră), nu pot fi evidențiate prin electroforeza pe hîrtie.

b. **Tehnici electroforetice cu sensibilitate crescută**

1) *Electroforeza pe bloc de amidon* la pH alcalin (8,6) este un excelent procedeu de triere, chiar și a formelor minore. Ea poate fi efectuată și în laboratoarele în care se execută electroforeza pe hîrtie, cu condiția să existe un spectrofotometru pentru citirea eluțiilor. Prin această tehnică poate fi recoltat sînge de la colectivități mari (școli, intreprinderi, cazărmi) cu păstrarea lui la congelator, prelucrarea și citirea putînd fi efectuată eșalonat după mai multe zile sau chiar săptămîni.

După terminarea migrării (care pentru majoritatea procedeelor este de circa 16—20 de ore), spoturile, împreună cu suportul de migrare se eluează, iar eluatul filtrat și centrifugat se citește la spectrofotometru la 625 mμ. Migrarea Hb în bloc de amidon nu poate fi făcută la un voltaj mare (peste 200—300 V) deoarece amidonul se gelifică.

Dintre celelalte suporturi de migrare utilizate amintim:

2) *Electroforeza pe gel de amidon* este mai laborioasă (eluție dificilă) însă permite o mai bună separare a două hemoglobine cu migrare apropiată, mai ales cînd una este în exces față de cealaltă; cu ajutorul ei este posibilă separarea Hb F în concentrație sub 1%. Spre deosebire de blocul de amidon care permite eluarea Hb F și A_2, gelul de amidon nu permite efectuarea de eluții din Hb A_2.

3) *Electroforeza pe geloză* (gel de agar) în mediu acid (pH 6,2) realizează o diferențiere și mai sensibilă a hemoglobinelor cu migrare apropiată.

4) *Electroforeza pe poliacrilamidă* este, de asemenea, mai dificilă ca tehnică, dar prezintă o sensibilitate crescută pentru fracțiunile minore.

5) *Electroforeza pe acetat de celuloză* (fîșii înguste de „hîrtie" de acetat de celuloză furnizate în ambalaj original) are avantajul unei migrări rapide (circa 2—3 ore); calitativ, datele obținute sînt avantajoase, atît prin sensibilitatea lor, cît și prin rapiditate, însă suporturile sînt relativ costisitoare pentru investigații de masă.

În unele împrejurări, cînd migrarea electroforetică a unor Hb este foarte apropiată, se recurge la utilizarea unor suporturi la pH variat. Pentru unele hemoglobine (și pentru anumite proporții ale acestora) nici cele mai sensibile metode nu pot realiza o separare satisfăcătoare. Singurele hemoglobine care pot fi recunoscute electroforetic cu certitudine sînt hemoglobinele S și F datorită posibilităților de verificare suplimentară;

Scanned with OKEN Scanner

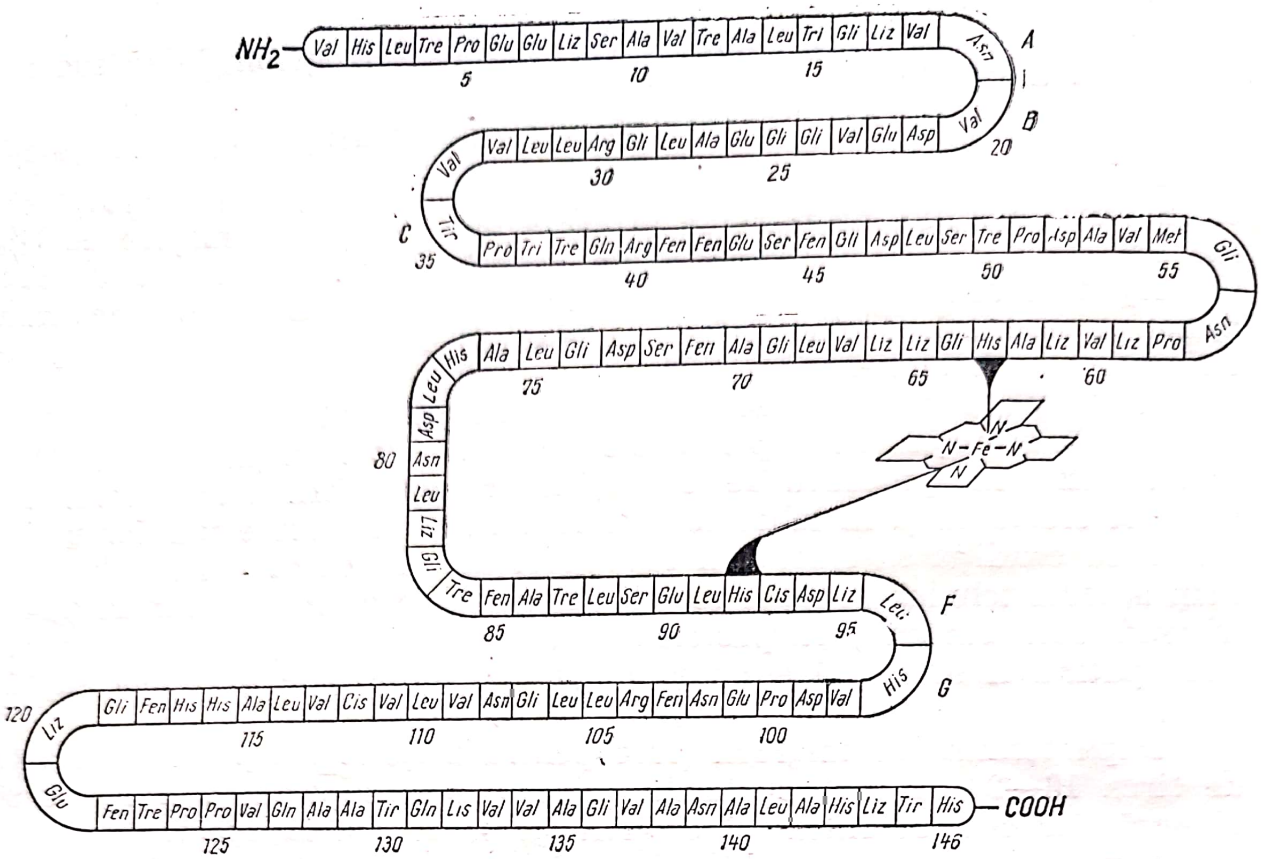


Fig. 5-28. Dispoziţia acizilor aminaţi în lanţul β al hemoglobinei A majore.

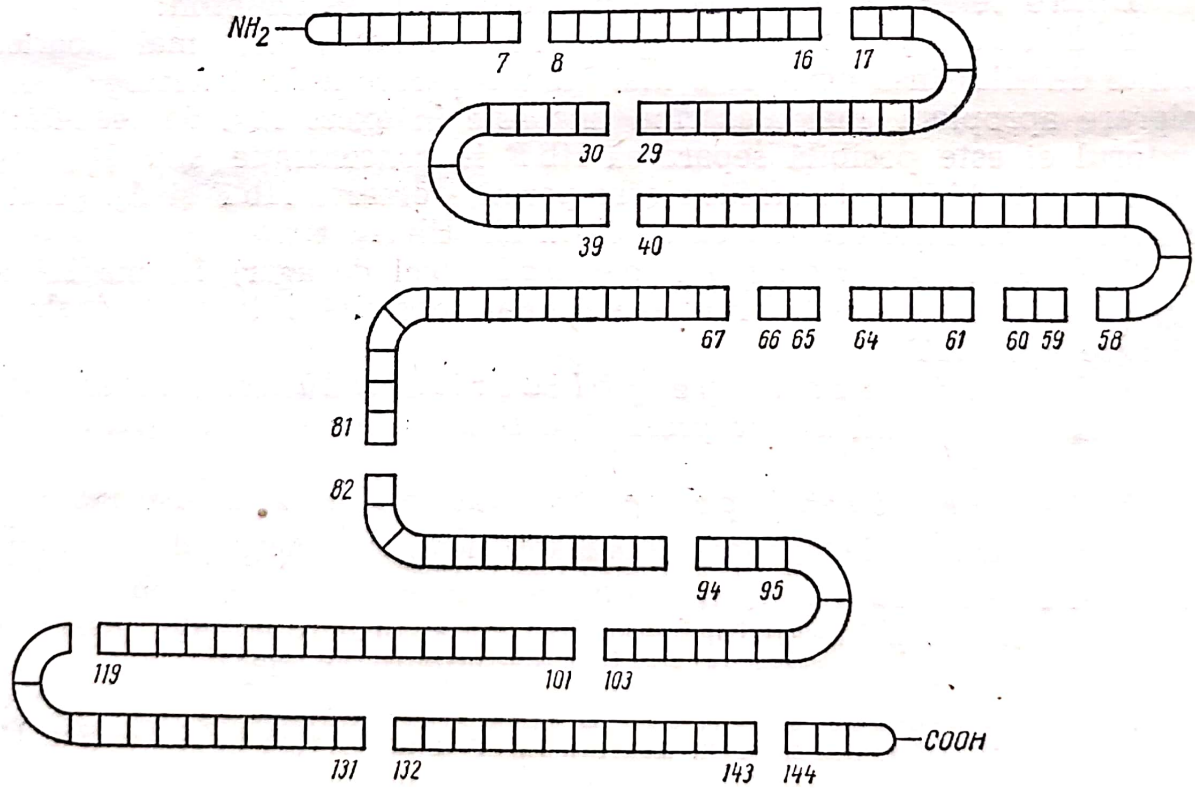


Fig. 5-29. Aspectul segmentat al lanţului polipeptidic β cu ajutorul digestiei proteolitice.

Tripsina scindează structura primară a lanţului la nivelul legăturilor dintre lizină şi arginină. Spre deosebire de electroforeza clasică a hemoglobinei, unde lanţul polipeptidic integru migrează „solidar" într-un spot unic, prin proteoliză, fiecare segment migrează pe seama lui, cu o viteză dată de încărcarea electrică a radicalilor laterali, ceea ce permite distanţarea lor. Migrarea acestor segmente se face la voltaj înalt (pînă la 5 000 V), timp de 1—2 ore.

Scanned with OKEN Scanner

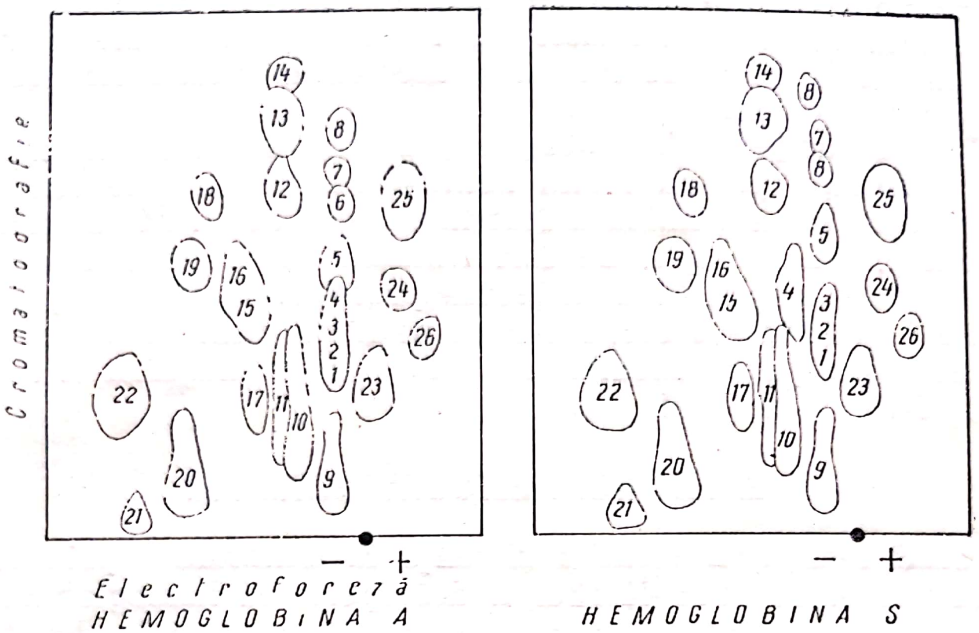


Fig. 5-30. Aspectul „amprentelor digitale" (finger print) rezultate din combinarea bidimensională a electroforezei (disocierea peptidică orizontală) urmată de cromatografie (disociere verticală, perpendiculară pe cea orizontală, după digestia triptică a hemoglobinei (desen după Ingram, 1961).

Pe figuri se văd spoturile care corespund cu locurile de migrare a peptidelor sau a grupelor de peptide. Numărul petelor este mai mare decît cel rezultat din digestia triptică a unei catene izolate (fig. 5-29), deoarece la formarea amprentelor participă toate lanțurile de hemoglobină (α, β, δ și chiar ϰ). Prin aceasta, pentru un anumit tip de hemoglobină se obțin totdeauna imagini identice. În stînga — aspect de „finger print" din hemoglobina A, iar în dreapta — din Hb S; aceasta din urmă diferă de Hb A prin peptidul nr. 4, care se găsește mai la stînga și izolat. Fragmentele de hîrtie ce conțin aceste spoturi se decupează, după care se procedează la analiza chimică a acizilor aminați. În prezent se cunoaște conținutul de acizi aminați al fiecărui spot normal, care își are locul, mărimea și forma lui fixă. În cazul în care apar deosebiri față de normal, se trece numai la analiza acizilor aminați ai spotului aberant.

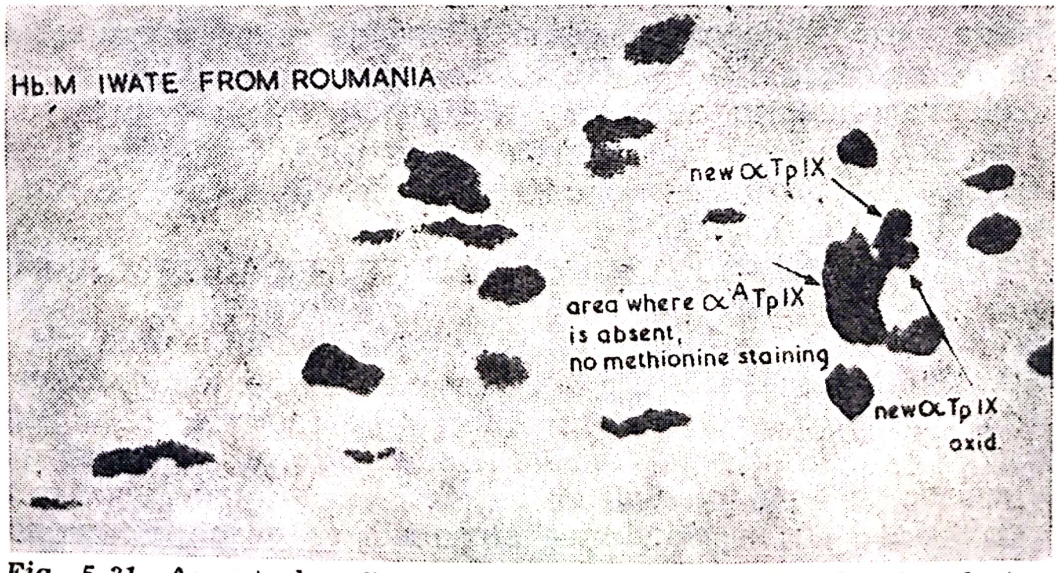


Fig. 5-31. Aspect de „finger print" (amprente digitale) în electroforeza combinată (fotografie după V. Brațu, C. Predescu, H. Lehman, 1971, într-o Hb Iwate, descoperită în România).

pentru prima controlul suplimentar este testul de siclizare, iar pentru cealaltă testul de alcalino-rezistenţă. Testul de labilitate termică este metoda de verificare a Hb instabile; acestea, de multe ori, nu dau modificări electroforetice.

c. **Tehnica amprentelor („finger print").** Determinarea exactă a localizării anomaliei pentru restul hemoglobinelor impune controlul prin *finger print*. Această tehnică a fost imaginată de V. M. Ingram în 1956 şi perfecţionată de Sanger. Ea este utilizată pentru determinarea conţinutului în acizi aminaţi din molecula proteică. Metoda amprentelor digitale este în realitate o electroforeză pe hîrtie urmată de cromatografia aplicată în sens perpendicular faţă de sensul mişcării electroforetice (fig. 5-28, 5-29, 5-30, 5-31).

2. TEHNICI NEELECTROFORETICE

a. **Alcalino-rezistenţa** sau rezistenţa la denaturare prin alcalii este o metodă veche. În 1886 Körber a descoperit că hemoglobina fetală se deosebeşte de cea adultă printr-o rezistenţă crescută la denaturarea cu soluţii alcaline. Prin această tehnică se dozează cantitatea de Hb F prezentă în sîngele cercetat; în mod normal doar 1,5% din hemoglobina adultului rezistă la o soluţie de Na OH N/10, pe cînd sîngele din cordonul ombilical rezistă într-o proporţie de 60—80%. În talasemia homozigotă Hb F variază între 30 şi 60% putînd să se ridice la valori de 90%, fără să existe corelaţii între proporţia acesteia şi gravitatea clinică. Deosebirile dintre cele două hemoglobine la denaturarea alcalină s-ar datora unor legături chimice diferite stabilite între catenele lor, explicaţie bazată pe faptul că Hb Bart's (γ 4) are şi ea o rezistenţă scăzută la alcali.

b. **Solubilitatea hemoglobinei.** Faptul că proteinele sînt foarte sensibile la anumiţi factori, cum sînt concentraţia sărurilor şi pH-ul, face posibilă distingerea Hb F de Hb A, prima fiind mai solubilă în tampon concentrat de fosfat. Această metodă vine în ajutorul diferenţierii unor hemoglobine care la electroforeză au viteze de migrare egale sau foarte apropiate, de exemplu Hb S şi Hb D. Hemoglobina drepanocitară în stare redusă este foarte puţin solubilă, precipitînd într-o soluţie de fosfat 2,24 M, pe cînd Hb D rămîne solubilă în această soluţie. În timp ce raportul solubilităţii în apă a formei reduse de Hb A faţă de a celei oxidate este de 50%, pentru Hb S el scade la 1%.

c. **Testul de stabilitate termică** constă în încălzirea soluţiei de hemoglobină la 50° timp de o oră. Hemoglobina normală nu suferă modificări decît după 24 h, pe cînd hemoglobinele instabile precipită precoce la această temperatură. De altfel punerea în evidenţă a acestor Hb nu s-ar putea face nici electroforetic, nici cromatografic. Precipitarea Hb în eritrocite duce la apariţia corpilor Heinz. Pentru acest test nu se foloseşte hemolizatul prin precipitare cu cloroform (întrucît acesta ar putea antrena Hb instabilă în fracţiunea stromală) ci o soluţie tamponată la un pH anumit.

d. **Testul de siclizare.** Hemoglobina din siclemie se polimerizează în „baghete" lungi numite tactoizi (vezi pag. 200), ducînd la deformarea eri-

Scanned with OKEN Scanner

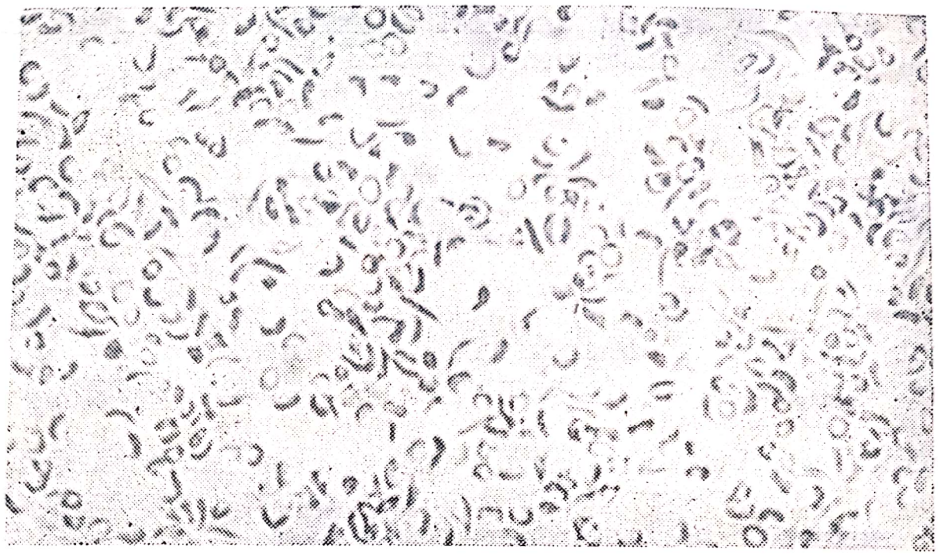


Fig. 5-32. Demonstrarea siclizării eritrocitelor purtătoare de hemoglobină S (col. Predescu V., Bratu V., 1970).

Incubarea picăturii de sînge cu o soluție de metabisulfit de sodiu 3% timp de o oră între lamă și lamelă parafinată pe margini (mediu lipsit de oxigen). Bolnava T. I. de 17 ani cu dublu heterozigotism (mama talasemie, tatăl siclemie).

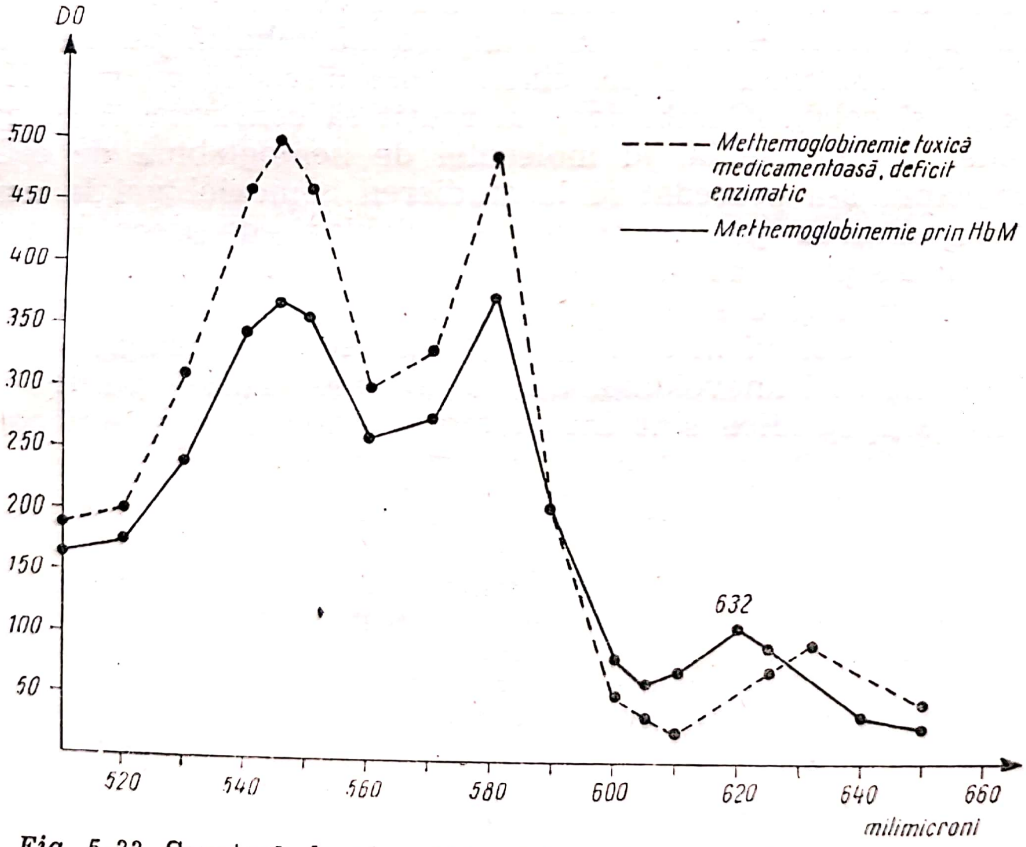


Fig. 5-33. Spectrul de absorbție al hemolizatului în diferite cazuri de methemoglobinemie (după V. Bratu, 1972).

Hemoglobina normală are un maximum de absorbție între 540 și 578 μm, pe cînd methemoglobina provenită din hemoglobina normală (intoxicații, ingestie de medicamente, enzimopatii) are un maxim de absorbție la 632 μm; methemoglobinele provenite din hemoglobinele M (hemoglobinopatii) au un maximum de absorbție sub acest nivel (605, 510, 617 și 620 μm), în funcție de tipul de hemoglobină M.

Scanned with OKEN Scanner

trocitelor în formă de seceră și uneori la apariția de baghete suplimentare în formă de spice. Siclizarea nu apare în sîngele bogat în oxigen, cum este sîngele circulant (spre deosebire de sîngele din organele de stază). Dacă sîngele este ținut între lamă și lamelă (parafinate) timp de 24 de ore, eritrocitele cu conținut de Hb S suferă această transformare. Pentru a grăbi consumul de oxigen din acest spațiu, o picătură de sînge se amestecă cu 2—3 picături de metabisulfit de Na 2% proaspăt, după care lama se citește la microscop la 1 și 2 ore (fig. 5—32).

e. **Evidențierea corpilor Heinz.** Anumite hemoglobine, mai ales patologice, pot precipita în conglomerate mari care se examinează la microscopul cu imersie (agregate pentenare globuloase) (57) (vezi și cap. 3, pag. 210).

f. **Controlul spectrofotometric al sîngelui** este foarte prețios în methemoglobinopatii, putîndu-se stabili natura methemoglobinemiei (toxică, prin deficit enzimatic sau prin hemoglobinoză M (fig. 5—33) (52).

g. **Procedee imunologice.** Hemoglobina umană posedă o foarte slabă putere antigenică încît procedeele imunoelectroforetice încercate nu au dat rezultatele scontate. Se depun eforturi pentru introducerea acestei metode pentru hemoglobinele greu separabile prin electroforeza obișnuită. Unii autori au reușit să prepare seruri de cobai care separă Hb A de Hb C, dar aceste procedee sînt încă în stadiul de cercetare.

h. **Difracția cu raze X.** Cea mai importantă tehnică pentru studierea detaliilor tridimensionale ale proteinelor este difracția cu raze X. Kendrew, Perutz și colab. (Cambridge) au reușit să construiască cu ajutorul ei un model tridimensional al moleculei de hemoglobină de cal, după același principiu s-a procedat și la studierea hemoglobinei la om. Este necesară cristalizarea prealabilă a hemoglobinei deoarece numai sub această formă se pretează la studiul difracției. Cu cît un cristal are dimensiuni mai mici și o structură mai simplă, cu atît este mai ușor de studiat; cu cît ne apropiem de structuri biologice mai complicate, cu atît studierea devine mai anevoioasă. Cu această metodă, s-a putut confirma că lanțurile polipeptidice sînt încovoiate formînd o structură compactă (137, 184).

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 6

METABOLISMUL FIERULUI

Fierul* se găsește pretutindeni în natură, în pămînt, în apă și în organismul tuturor viețuitoarelor; viața celulară nu este posibilă fără prezența acestui metal. Participarea ionului anorganic de fier la metabolismul general este posibilă datorită solubilității lui în umorile organismului, unde se combină cu diverse substanțe proteice. Participarea fierului la viața celulară constă în potențarea metabolismului unor substanțe organice, cărora le imprimă o mai mare reactivitate și le accelerează viteza reacțiilor chimice.

Istoric. Cunoașterea fierului are două etape fundamentale, una marcată de descoperirea lui în natură, care datează de prin anii 1500—1200 î.e.n. (epoca fierului) și alta de recunoașterea lui ca element constituent al organismului care datează abia din secolul al XIX e.n. (117). În afară de utilizarea fierului la confecționarea uneltelor și armelor, virtuțile sale terapeutice au fost cunoscute empiric încă de către popoarele vechi, care dădeau fier soldaților pentru a-i face mai viguroși. Tot empiric, ca tonifiant, se administra fier în sec. XVI pentru tratarea clorozei, fără să se știe că tratamentul marțial stă la baza terapiei etiologice a anemiilor feriprive. Menghini (1745) obține fier din sîngele animalelor. Prima probă a rolului său biologic (prezența lui în molecula de hemoglobină) datează abia din secolul al 19-lea. Descoperirea existenței fierului plasmatic este și mai recentă; ea a fost semnalată în 1925 de către Fontes și Thivolle (23).

Studii temeinice în legătură cu metabolismul fierului s-au efectuat abia în preajma celui de-al doilea război mondial. Pînă prin 1950 existau încă foarte multe probleme nelămurite și date contradictorii, care, odată cu utilizarea izotopilor radioactivi în studiul metabolismului fierului, au fost în mare parte lămurite, realizîndu-se importante progrese în domeniile conexe de fiziopatologice și terapeutică.

Izotopii fierului. Fierul are o greutate atomică de 55,85; aceasta provine din media greutăților atomice (la proporțiile respective) ale celor doi izotopi stabili întîlniți în natură: Fe_{56} și Fe_{54}. În afară de aceștia s-a

* *Sideros*, cuv. gr.=fier, de aici numeroase derivate: siderofilină, hemosiderină etc.; *marțial*=de război (cuvînt derivat de la numele zeului Marte), de aici cuvinte derivate ca tratament marțial, carență marțială etc.

Scanned with OKEN Scanner

creat artificial un număr de izotopi instabili sau radioactivi, cu aceleași proprietăți fiziologice ca și ale celor stabili (tabelul 6-1). Dintre izotopii stabili, de departe cel mai răspîndit în natură este Fe_{56}, iar dintre izotopii radioactivi cel mai utilizat este Fe_{59}; el are o perioadă de înjumătățire (T 1/2) de 47,1 zile, fapt care îi conferă mari avantaje pentru cercetările medicale. Datorită emisiunii de raze γ, Fe_{59} este ușor de detectat cu contoare obișnuite. Fe_{52}, care are o perioadă de înjumătățire foarte scurtă (8 ore), nu poate fi aplicat în urmărirea ferokineticii, iar Fe_{55}, care are o perioadă de înjumătățire foarte lungă ($2^1/_2$ ani) poate deveni nociv pentru organism; este utilizat în doze infime sau experimental în anumite cercetări ferokinetice de lungă durată. Odată pătruns în organism un izotop radioactiv este metabolizat la fel ca și izotopul stabil, organismul nefăcînd diferență între aceștia. În tot acest timp, fierul marcat poate fi urmărit prin detectoare de radiații, atît în interiorul organismului, cît și în eșantioane de plasmă, eritrocite sau alte celule, țesuturi sau produse de excreție (23).

Tabelul 6-1

Caracteristicile principalilor izotopi de fier radioactiv (După Y. NAJEAN și col.)

Izotopul fierului	Perioada de înjumătățire	Tipul dezintegrării	Energie în radiații (mcV)	Observații
^{52}Fe	8 ore	$\beta+$, captură de electroni	$\beta+$ 0,80 γ 0,163	emisie foarte slabă
^{55}Fe	2,6 ani	captură de electroni	0,22	
^{59}Fe	47,1 zile	$\beta-$, γ	$\beta-$ 0,27 și 0,46 γ 1.10 (57%) 1,29 (43%)	

I. COMPUȘII FERUGINOȘI DIN ORGANISM

Fierul este un constituent al tuturor celulelor din organism. Conținutul total de fier al unui adult este de 4—5 g. Bărbatul deține circa 50 mg de fier pe kg greutate corporală, iar femeia circa 35 mg (tabelul 6-2). Datorită fierului hemoglobinic, el ocupă primul loc pe lista oligoelementelor, situîndu-se, cantitativ, cu mult înaintea altora ca zincul, cuprul, cobaltul, nichelul, iodul, fluorul, bromul, care sînt în cantități infinitezimale (vezi tabelul 4-1). Ca toate aceste elemente, fierul nu se află izolat, ci în combinație cu proteinele; fierul ionizat, nelegat de proteine, se află în cantități infime în organism (78, 103, 194). Ionul de fier — de la absorbție pînă la eliminare — urmează o linie sinuoasă,

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 6-2

Distribuția aproximativă a compușilor feruginoși din organism în stare fiziologică

A. *Combinații heminice*	
1. Agenți transportori ai oxigenului atmosferic:	
a. *hemoglobina:* transportor circulant de O_2 cu structură de tetramer	2,50—3,50 g (60—70%).
b. *mioglobina:* transportor static de O_2 cu structură de monomer	0,10—0,20 g (5%).
2. Enzime cu rol în respirația celulară:	
a. *catalazele* și *peroxidazele* b. *citocromii, citocromoxidazele, triptofanpirolaza*	0,025 g
B. *Combinații neheminice*	
1. Proteina plasmatică cu rol în transportul fierului:	
transferina sau *siderofilina*	0,003 g
2. Proteine tisulare cu rol în depozitarea fierului	
a. *feritina* b. *hemosiderina*	1,00—1,50 g
3. Enzime celulare	
— flavoproteinele	urme
TOTAL FIER ÎN ORGANISM	3—5 g

alternînd între forma bivalentă, redusă, de fier feros (Fe^{++}) și forma trivalentă, oxidată, de fier feric (Fe^{+++}). Formele sub care fierul poate fi legat de proteine sînt multiple; cel mai frecvent se întîlnește forma de heteroproteină, în care proteina este legată de fier prin intermediul unei grupări prostetice. În funcție de natura acesteia se deosebesc combinații heminice și combinații neheminice (fig. 6-1).

A. FIERUL HEMINIC

Combinarea unor proteine cu o grupare prostetică heminică dă naștere cromoproteidelor. În molecula de oxihemoglobină fierul se găsește în stare feroasă, avînd 6 legături, din care 2 covalente și 4 coordinative (vezi și fig. 5-2). Combinația fierului feric cu o moleculă de protoporfirină dă naștere *hematinei,* iar transformarea trivalentă a fierului în molecula de hemoglobină dă naștere *methemoglobinei*; în acest compus fierul are

Scanned with OKEN Scanner

o legătură covalentă suplimentară cu oxigenul, în detrimentul uneia din cele patru legături necovalente. Hematina (oxihem) se prezintă ca o pulbere amorfă de culoare brună, ce poate cristaliza prin fierbere cu acid acetic glacial și NaCl, dînd naștere clorhidratului de *hemină*, care formează *cristalele Teichmann* în reacția de identificare a petelor de sînge.

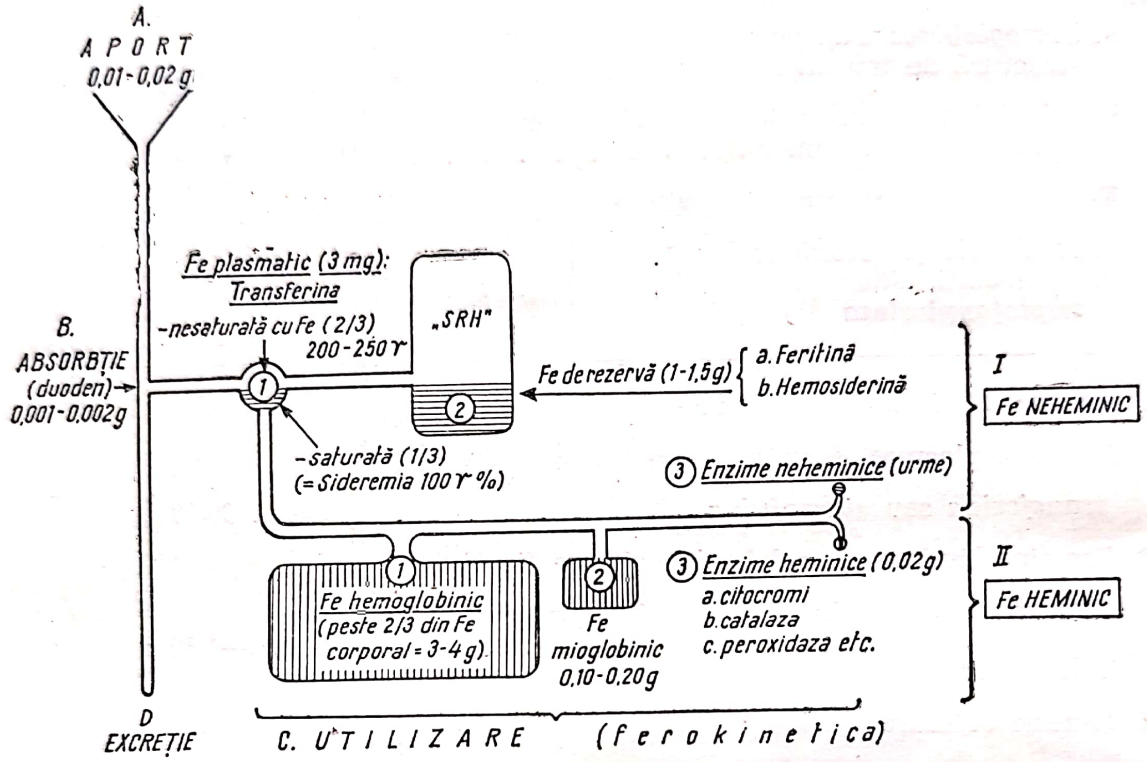


Fig. 6-1. Reprezentare intuitivă a formelor de prezentare și a circuitului fierului în organism.

Hematina (forma amorfă) și hemina (forma cristalizată) dau naștere, prin reducere, hemocromogenului. Scindarea fierului din acest complex duce la apariția porfirinei care, în stare pură, este de culoare roșie-violetă. Porfirinele se pot combina cu metalele; una din aceste combinații este însuși hemul (37, 99, 143, 159, 247).

1. COMPUȘII TRANSPORTORI ȘI ACUMULATORI DE OXIGEN: HEMOGLOBINA ȘI MIOGLOBINA (vezi și cap. 5).

a. **Hemoglobina** (vezi cap. 5)

b. **Mioglobina** este pigmentul mușchilor. Spre deosebire de tetramerul de hemoglobină, mioglobina nu are decît o structură terțiară fiind un monomer alcătuit din 152 de acizi aminați, legat de un grup prostetic identic cu al globinei; de aceea, greutatea ei moleculară este de aproape patru ori mai mică decît a hemoglobinei.

Mioglobina este o importantă rezervă de oxigen pentru mușchi în faza de activitate (mai ales pentru miocard), evitîndu-se contractarea unei „datorii de oxigen" cînd presiunea acestuia se reduce în sînge. Funcțio-

nal, mioglobina prezintă deosebiri importante față de hemoglobină; în afară de faptul că nu este circulantă, forma hiperbolică a curbei de disociere arată o afinitate mult mai mare pentru O_2 (vezi fig. 4-14), pentru cedarea căruia necesită o scădere importantă a concentrației parțiale a O_2 și un pH scăzut al mediului, condiții realizate în cursul travaliului muscular. Conținutul mare de mioglobină al mușchilor mamiferelor acvatice (focă, balenă etc.) le permite să se poată menține sub apă timp îndelungat. Inactivitatea musculară și malnutriția reduc conținutul în mioglobină al mușchilor.

Pînă în prezent au fost identificate mai multe varietăți de mioglobină umană (aproximativ 1 la 500 de indivizi este purtătorul unei astfel de varietăți). Pentru unele din acestea s-a stabilit și modificarea de secvență în structura primară față de mioglobina normală.

2. ENZIME CU ROL ÎN RESPIRAȚIA CELULARĂ

Aceste enzime utilizează oxigenul molecular sau atomic pe care îl combină cu hidrogenul; din această reacție rezultă o cantitate importantă de energie necesară în multiple procese metabolice aerobe, cuprinse sub termenul general de „respirație celulară" (117).

a. **Catalazele și peroxidazele.** Aceste enzime eliberează O_2 din peroxizi (apă oxigenată).

1) *Catalaza* este o enzimă care descompune apa oxigenată în H_2O și O_2; ea este de fapt o H_2O_2-oxidoreductază, numită dintr-o eroare catalază (54). Structura chimică este asemănătoare, în linii mari, cu a hemoglobinei; conține 4 grupări feroprotoporfirinice (hem) atașate la un tetramer proteic cu o greutate moleculară considerabil mai mare decît a globinei (240 000), a cărui structură nu este încă cunoscută. Fiecare catenă polipeptidică ar conține 450 de acizi aminați. Este dovedită heterogenitatea structurii ei proteice; prin separarea electroforetică și cromatografică s-au obținut trei fracțiuni notate cu A, B și C.

Catalaza este o enzimă foarte răspîndită, atît în țesuturile animale, cît și în cele vegetale. În cantitate mare se găsește în anumite organe (ficat, rinichi). Eritrocitele, mai ales la om, conțin diverse varietăți de catalază aflată în stare liberă; se găsește în cantitate crescută în reticulocite și scade treptat pe măsura îmbătrînirii eritrocitului. În eritrocit catalaza protejează hemoglobina și alte substanțe oxidabile, față de anumiți agenți oxidanți ca H_2O_2, H_2O, —OH etc. Nivelul normal de activitate al catalazei sanguine este variabil. Se cunoaște o entitate morbidă numită *acatalasemie* sau *boala Takahara*, în care catalaza este absentă în eritrocite și mult scăzută în alte țesuturi.

2) *Peroxidazele* sînt, ca și catalazele, enzime heterogene. În timp ce catalazele acționează direct asupra apei oxigenate eliberînd O_2 sub formă moleculară ($2\ H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$), peroxidazele acționează tot asupra H_2O_2, însă eliberează oxigenul sub formă atomică, necesitînd fixarea lui pe un substrat acceptor). Pînă în prezent se cunosc mai multe forme structurale în care variază, atît proteina, cît și gruparea prostetică.

Scanned with OKEN Scanner

b. **Citocromii.** Aceste enzime heminice intervin în oxidarea biologică fiind transportori de electroni cu schimbarea de valență a atomului de fier (echivalențe de reducere). Ele au fost descoperite datorită proprietății lor de a absorbi lumina. Se găsesc în toate celulele, fiind localizate predominant în mitocondrii. După dispoziția benzilor de absorbție au fost descrişi citocromii a, b şi c; citocromul c pare să fie identic cu fermentul respirator galben Warburg (fig. 6-2). Ulterior au apărut şi alte subîmpărțiri pe baza deosebirilor componentelor lor proteice (163).

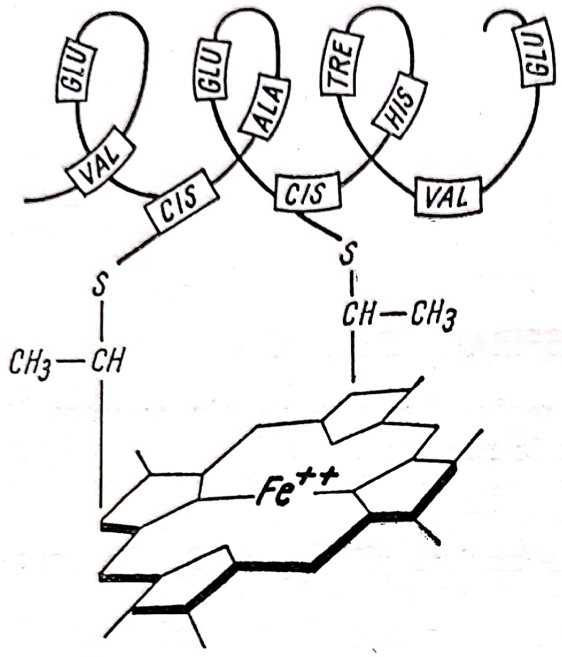


Fig. 6-2. Formula simplificată a citocromului C (după P. Karlson, 1967).

Citocromul C este o heteroproteină alcătuită dintr-un lanț polipeptidic, cu o greutate moleculară de 12 000, combinat cu o grupare hem. Spre deosebire de hemoglobină, între aceste grupări există legături covalente prin doi radicali laterali ai inelului tetrapirolic şi două grupări -SH a 2 acizi aminați (cisteine) din lanțul polipeptidic (legături tioeterice stabile ce nu pot fi desfăcute prin hidroliză). Hemul este ascuns în interiorul anselor proteice încît nu reacționează cu O_2, CN^- sau CO.

B. FIERUL NEHEMINIC

Fierul neheminic reprezintă partea cea mai variabilă a fierului din organism; el este reprezentat de fierul de transport (transferina), fierul de rezervă (feritina şi hemosiderina) şi în măsură infimă de enzimele neheminice (metaloflavoproteinele).

1. FIERUL PLASMATIC

Transferina sau siderofilina. Fierul este preluat şi transportat de la locul de absorbție (tractul digestiv) la locurile de prelucrare (măduva hematogenă) sau de depozitare (diverse viscere), precum şi de la un loc de depozitare la altul, prin intermediul unei proteine plasmatice specifice, numită transferină sau siderofilină. Aceasta pare să fie unicul transportor de fier din organism care face legătura, în toate sensurile, între diversele compartimente ale fierului.

Transferina este o β_1-globulină de culoare roz sintetizată, probabil, în ficat. Greutatea ei moleculară este de circa 74 000. Cantitatea totală a transferinei plasmatice este de circa 10 g. Fiecare moleculă de transferină fixează doi atomi de fier trivalent în două locuri separate. De lanțul polipeptidic se leagă două grupări prostetice identice, terminate în acid sialic. Fierul poate fi separat cu uşurință de transferină în mediu acid (pH 4) sau alcalin (pH 9), precum şi prin citrați, EDTA etc. placenta captează fierul pentru nevoile fătului, din transferină, chiar cînd nivelul acestuia este foarte scăzut.

În sînge, transferina este supusă unei degradări continue; timpul de înjumătățire se situează între 6 şi 12 zile. Transferina începe să fie sin-

Scanned with OKEN Scanner

tetizată de timpuriu în embrionul uman (la sfîrşitul primei luni după constituire). Structura moleculară a transferinei nu este identică la toţi indivizii (fig. 6-3).

Fierul absorbit prin mucoasa intestinală este preluat de transferină, care îl transportă prin capilarele sanguine din teritoriul venei porte;

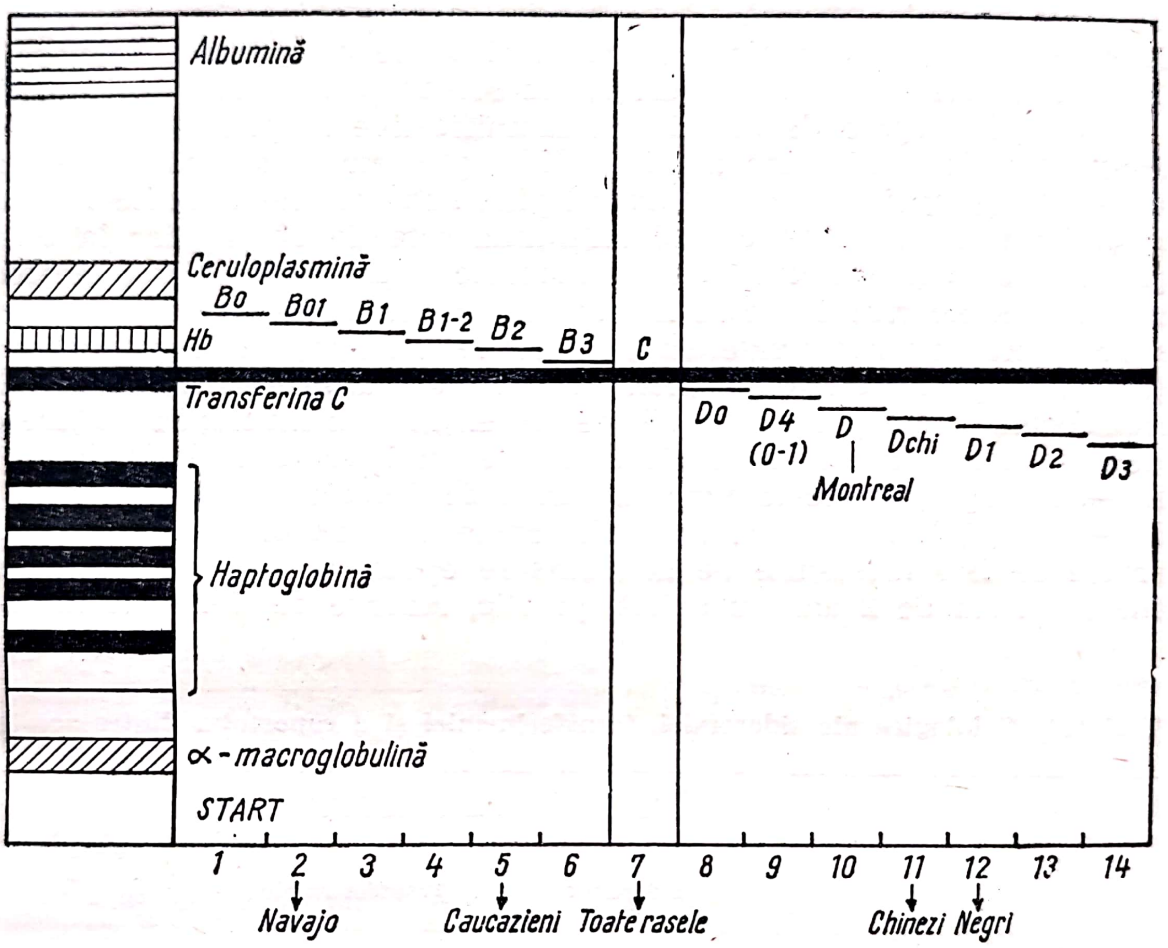


Fig. 6-3. Vitezele de migrare electroforetică în gel de amidon ale diferitelor tipuri de transferină (după Parker şi Bearn, 1963, modificat de J. M. Fine). Pînă în prezent au fost identificate 18 variante genetice de transferină, diferenţiate printr-un singur acid aminat. Toate aceste variante nu prezintă deficienţe în legarea şi transportul plasmatic al fierului. Majoritatea populaţiei umane este homozigotă pentru tipul notat cu litera C; la heterozigoţi apar două tipuri de transferine.

aceste vase sînt mai bogate în fier decît cele din circulaţia generală; ficatul reţine o parte din fierul sanguin ce trece prin el. Cu toate că la nivelul intestinului există o abundenţă de vase chilifere, fierul nu ajunge în circulaţia limfatică.

Conţinutul în fier al sîngelui circulant se repartizează total diferit între eritrocite şi plasma sanguină. Marea majoritate este conţinută în hemoglobina eritrocitelor (circa 3 g) şi doar o cantitate infimă (circa 3 mg) se găseşte în plasmă, legat de proteine transportoare (transferină). Proporţia mare dintre cele două forme ale fierului circulant este deci de circa 1 000 : 1; prin sideremie se înţelege exclusiv fierul plasmatic.

Scanned with OKEN Scanner

1) *Variațiile fiziologice ale sideremiei.* Nivelul normal al fierului din plasma sanguină (sideremia) este de 80—160 μg%, ml în medie 120 μg%. Sideremia este supusă unor variații fiziologice importante după sex, vîrstă, orarul zilei, efort etc.

Variații legate de sex. La femeie valorile sideremiei sînt mai scăzute decît la bărbat; aceste variații sînt mai pronunțate decît ale celorlalte constante sanguine (număr de eritrocite, hemoglobină, hematocrit etc.). Diferențele dintre sexe țin, în primul rînd, de pierderile fiziologice de sînge la femeie, care se repercută direct asupra nivelului sideremiei.

Variațiile legate de vîrstă sînt semnificative în prima copilărie. La nou-născut sideremia este de circa 200 μg%, iar la o lună — de circa 160—180 μg, apoi continuă să scadă pînă sub valorile întîlnite la adult, astfel încît la vîrsta de 6 luni sideremia este de 80 μg, iar la un an ajunge la 60 μg. Aceste scăderi se datoresc disproporției dintre creșterea ponderală și aportul sărac de fier în această perioadă. Odată cu trecerea la o alimentație variată sideremia se reduce, ajungînd să fie proporțională cu talia și greutatea, astfel încît la pubertate atinge valorile adultului. Transferina se comportă la copii, de obicei, în sens invers; la naștere capacitatea totală de legare a fierului este mai scăzută decît la adult (200—250 μg% și crește pînă la vîrsta de 1 an cînd atinge valori de 350—400 μg%). Din cauza creșterii rapide a copilului în primul an rezervele de fier moștenite de la mamă se epuizează foarte repede, încît pînă la vîrsta de 2 ani nu există, practic, rezerve de fier (tabelul 6-3).

Tabelul 6-3

Variațiile fiziologice ale sideremiei, transferinemiei și a raportului dintre acestea

	În μg/100 ml de plasmă sanguină		
	Sideremie	Transferinemie	Coeficient de saturație cu fier a transferinei
ADULȚI			
— bărbați	130 (±50)	350 (±50)	30—40%
— femei	110 (±50)	300 (±50)	30—40%
COPII			
— nou-născut	200	200—250	80—90%
— 1 an	60	400	15—20%
— pubertate	ca la adult	ca la adult	ca la adult
RITM NICTEMERAL			
— dimineața	ca mai sus	ca mai sus	ca mai sus
— seara	scade cu 30—40 μg	ca mai sus	40%
Sarcină	70 (±20)	450 (±50)	15—20%

Scanned with OKEN Scanner

Diferențele dintre valorile matinale și serale nu sînt neglijabile; nivelul de fier scade continuu în cursul zilei încît seara ajunge la valorile cele mai scăzute, sideremia vesperală (cuv. lat. *vesper*=seară) ajungînd cu 1/4—1/3 mai coborîtă decît cea matinală.

Alimentația nu influențează semnificativ nivelul sideremiei, de aceea recoltarea sîngelui pentru sideremie nu trebuie condiționată de starea de nemîncare.

Efortul fizic nu modifică nici el semnificativ nivelul sideremiei, în timp ce stress-ul, administrarea de ACTH sau de cortizon produc scăderi semnificative ale fierului plasmatic.

2) *Saturația transferinei cu fier.* Fiecare moleculă de transferină conține doi atomi de fier feric. Un gram de transferină fixează 1,25 mg Fe (ceva mai mult decît raportul de 1 000 : 1). Deoarece transferina din 100 ml plasmă poate fixa aproximativ 0,30 mg fier (=300 μ), iar totalitatea sîngelui din organism (care cuprinde aproape 3 litri de plasmă) nu conține decît 3—4 mg de fier, rezultă că doar 1/3 din transferina totală este încărcată (în stare normală) cu fier; acest nivel reprezintă procentul de saturație a transferinei cu fier.

În condiții experimentale sau patologice de supraîncărcare forțată a plasmei cu fier, întreaga transferină poate fi saturată; cantitatea de fier fixat în aceaste condiții reprezintă capacitatea totală de saturație a transferinei cu fier. Procentul de saturație a transferinei se calculează din raportul:

$$\frac{\text{fier seric} \times 100}{\text{capacitatea totală de fixare a transferinei}}$$ care în mod normal este de 25—35%

Saturația cu fier a plasmei în proporție de 1/3 sau sub acest nivel face ca fierul să fie cedat, în primul rînd, pentru eritropoieză, în timp

Tabelul 6-4

Concentrația fierului plasmatic în diferite boli (modificat după L. Heilmeyer, 1968)

Hipersideremie	Hiposideremie
Boli de tezaurizare a fierului (hemocromatoze)	Carență generală de fier
Hepatită acută (nu și icterele prin retenție)	Infecții și tumori maligne
Eritropoieză scăzută (anemii aplastice, anemie pernicioasă etc.)	Postoperator, imediat după intervenție și persistă cîteva săptămîni
Anemii sideroacrestice (tulburări în distribuția fierului)	Hiperfuncția macrofagelor
În primele zile după hemoragii acute	Eritropoieza crescută (după hemoragii, hemolize etc.)
Anemii hemolitice (prin distrucție de eritrocite)	Atransferinemie
Lipsa de fixare a fierului în celulele reticulare (sindromul Shahidi)	Avitaminoză C

Scanned with OKEN Scanner

ce un grad de saturaţie mai ridicat facilitează cedarea fierului către celulele de depozit. Împiedicarea cedării fierului siderofilinic către eritroblaşti se întîlneşte în infecţii şi tumori, din cauza captării crescute a fierului seric de către celulele depozitante, cu scăderea consecutivă a fierului seric.

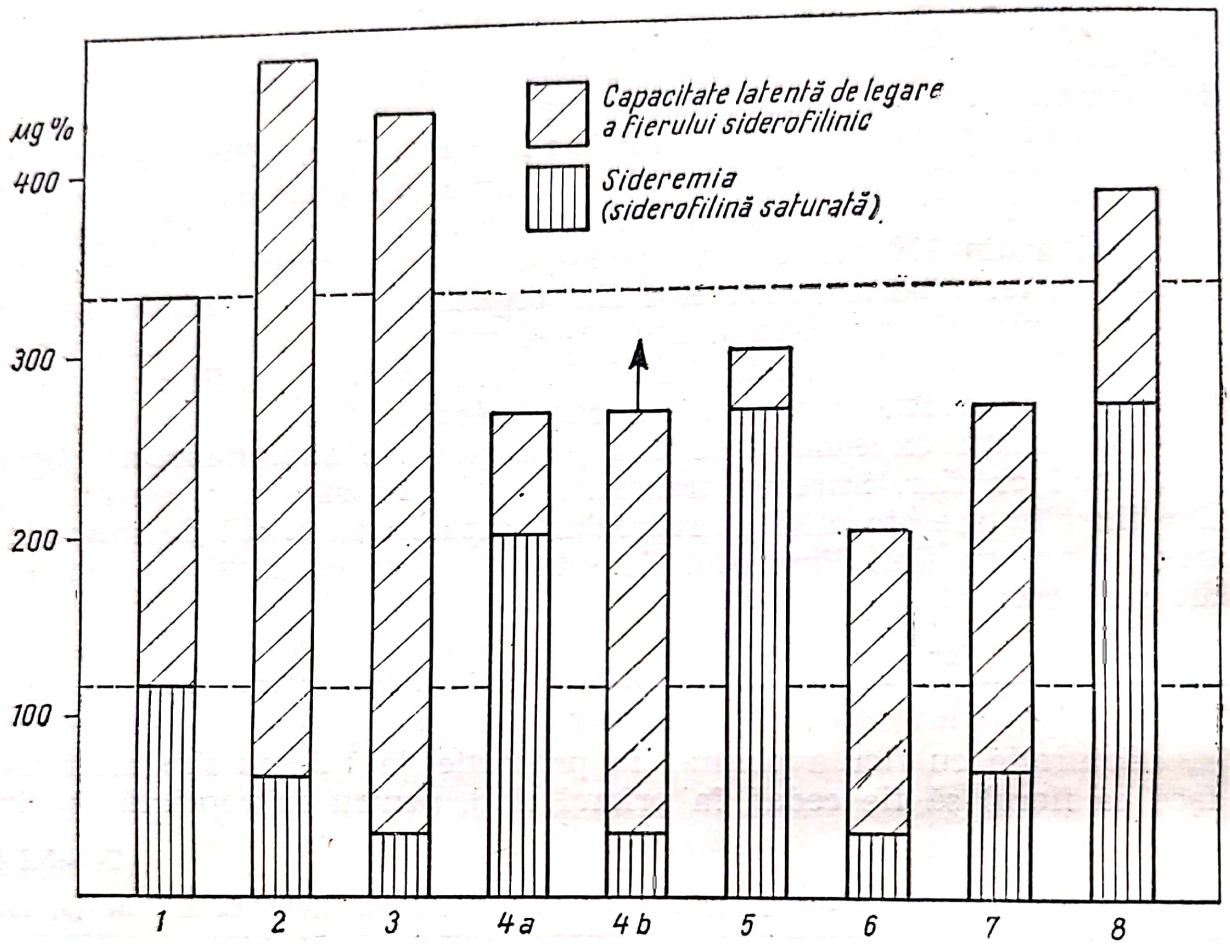


Fig. 6-4. Capacitatea totală de legare a fierului la individul normal, în comparaţie cu situaţia din diferite stări fiziologice şi patologice (după C. B. Laurel, 1952).

1. Adult normal. 2. Graviditate avansată şi copilărie. 3. Anemie feriprivă. 4 a. Anemie hemolitică, anemie pernicioasă, anemie aplastică şi nou-născut. 4 b. Anemie hemolitică şi anemie pernicioasă în cursul remisiunii. 5. Hemocromatoză şi hemosideroză posttransfuzională, anemie sideroblastică. 6. Infecţie acută. 7. Infecţie cronică, tumori maligne, mielom, uremie, nefroză, leucemie, ciroză hepatică, atrofie hepatică acută şi subacută, malnutriţie. 8. Hepatită acută (săptămîna a 2-a la a 4-a) (139).

3) *Variaţii patologice ale sideremiei.* Nivelurile sideremiei şi ale transferinei, precum şi raportul dintre ele, diferă foarte mult în diferite stări fiziologice şi patologice (fig. 6-4) (139, 194, 248).

Nivelul sideremiei şi cel a transferinemiei nu variază totdeauna în mod paralel, nici în stare fiziologică şi cu atît mai puţin în anumite situaţii patologice, de aceea determinarea lor concomitentă este adesea importantă pentru diagnostic.

Scanned with OKEN Scanner

În fig. 6-4 se observă că variațiile acestei valori se pot produce după următoarele tipuri:

a) variații paralele, în sens de:

— scădere (↘↘), ca în infecții, tumori, hipoproteinemie;

— creștere (↗↗), situație necaracteristică ce poate fi întîlnită în unele dereglări metabolice;

b) variații discordante, în sens

— divergent (↗↘), ca în copilărie, graviditate și mai ales în anemiile feriprive

— convergent (↘↗), ca în hemocromatoză.

4) *Toxicitatea fierului.* Fierul liber, necombinat, este toxic pentru celule, de aceea fierul intrat în organism se combină cu substanțe proteice. În caz de supradozare de fier (de exemplu prin injecții sau prin ingerare accidentală de către copii a bomboanelor cu preparate feroase), apare o stare de intoxicație manifestată prin grețuri, vărsături, tulburări de vedere etc., putîndu-se ajunge chiar la comă și moarte. Aceste efecte toxice sînt secundare unor perturbări enzimatice celulare. Este de înțeles că valabilitatea calculului de toleranță față de fierul administrat depinde de cantitatea de transferină nesaturată; cu cît aceasta este mai mare, de exemplu, în anemiile feriprive, cu atît poate capta o cantitate mai mare de fier, fără pericol de intoxicare și invers.

5) *Alimentarea precursorilor eritrocitari cu fier.* Mecanismul de pătrundere a fierului în celulele seriei roșii a fost studiat prin marcaj dublu: marcarea cu iod radioactiv a transferinei și marcarea cu radiofier a produsului de fier studiat. S-a constatat că precursorii eritrocitari se încarcă cu fier pe două căi principale, pe de o parte de la transferina plasmatică, iar pe de altă parte de la celulele macrofage care au fagocitat în prealabil eritrocite îmbătrînite (fig. 6-5). În ambele împrejurări penetrarea fierului în celule se face prin rofeocitoză.

Trecerea fierului plasmatic în eritroblești și în reticulocite, în vederea utilizării lui pentru sinteza hemului, a fost demonstrată, printre altele, cu ajutorul autoradiografiilor. Transferina nu pătrunde în eritroblești, ci depune fierul la suprafața acestora (fig. 6-6). În continuare fierul parcurge mai multe etape intermediare: alăturarea la o proteină neglobinică din membrana eritrocitară, apoi separarea de această proteină și pătrunderea în citoplasmă; aici, cu ajutorul hemsintetazei, fierul se leagă de protoporfirină, după care hemul își ia locul în „excavația" preformată globinică. Transferina se detașează de fier fără să se consume în cursul acestui proces. Transferina marcată nu se atașează de eritrocite ci numai de eritroblești și cel mult de reticulocite. Mecanismul prin care fierul părăsește transferina și se introduce în precursorii eritrocitari nu se cunoaște încă. Nu este exclus ca aceasta să se petreacă pe principiul competiției între două proteine, una transportoare și alta receptoare, ambele fixate pe membrana eritroblaștilor sau a reticulocitelor.

Scanned with OKEN Scanner

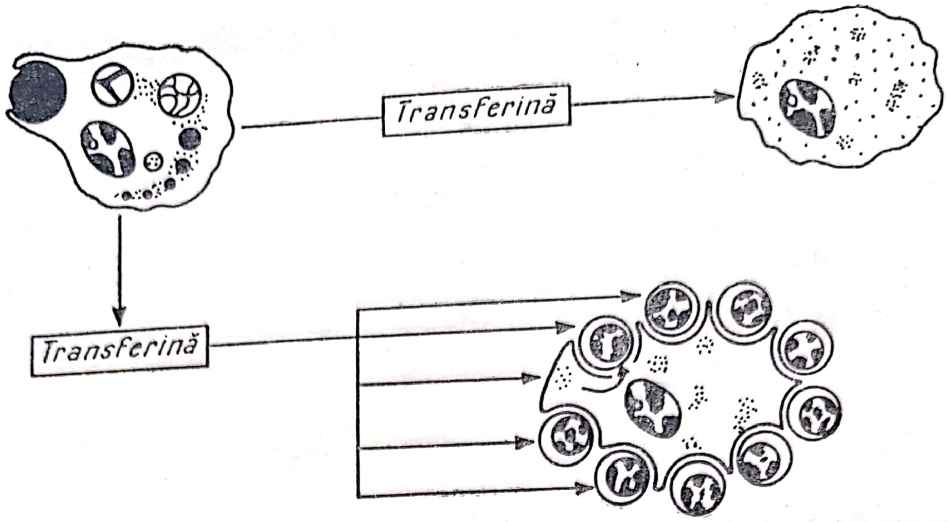


Fig. 6-5. Reprezentare schematică a rolului transferinei în circuitul fierului (după M. Bessis, 1966).

Eritrocitele fagocitate de către o celulă macrofagă (stînga), cedează transferinei fierul acumulat sub formă de feritină, printr-un proces de exocitoză (reversul rofeocitozei); aceasta îl transmite apoi altor celule reticulare — (la dreapta imaginii) — sau eritroblaştilor.

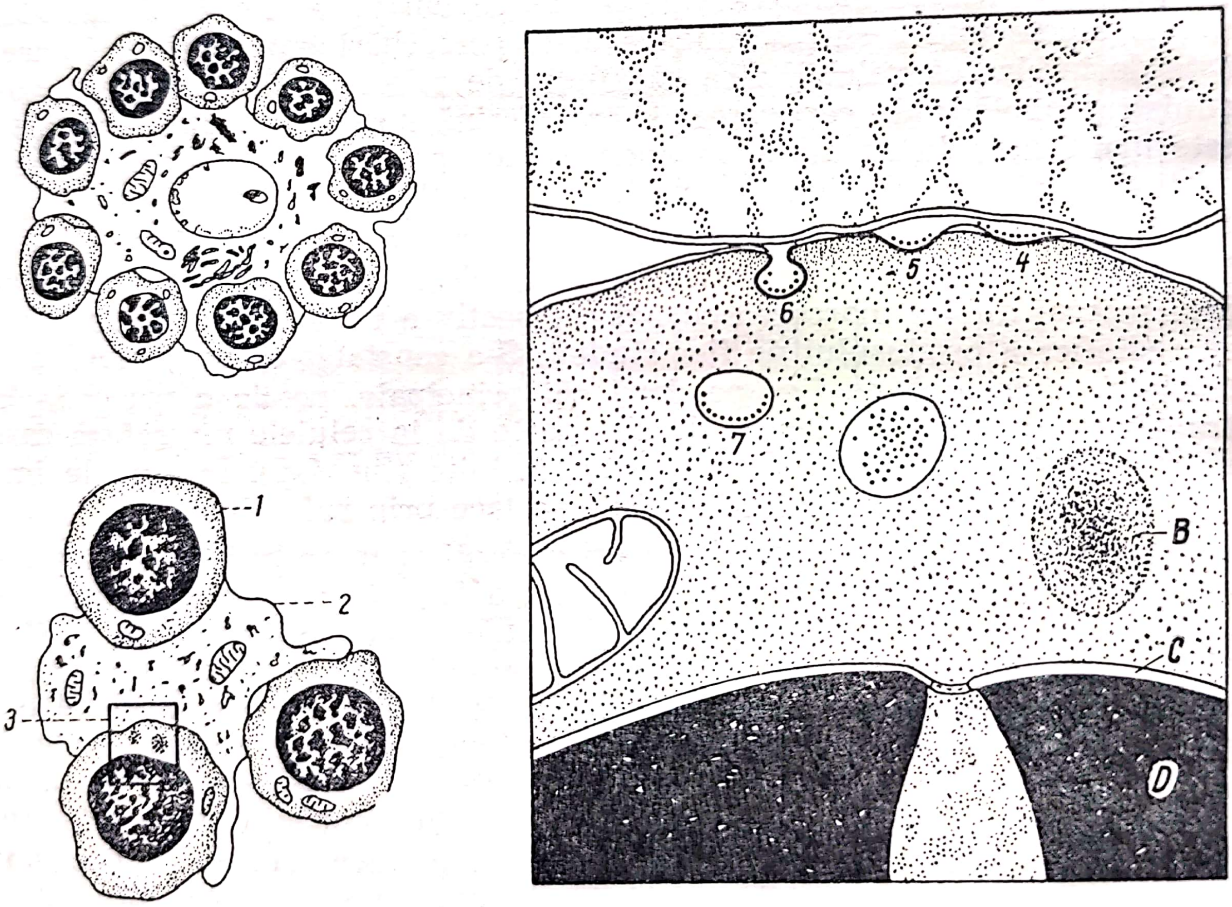


Fig. 6-6. Insulă eritroblastică şi alimentarea eritroblaştilor cu fier prin rofeocitoză (după M. Bessis, 1973).

Stînga sus: insula eritroblastică; eritroblaştii înconjură o celulă macrofagă sub formă de coroană; în interiorul ei se văd mase de hemosiderină. *Stînga jos:* secţiune prin 3 eritroblaşti ce înconjoară un fragment de citoplasmă. 1=eritroblast; 2=citoplasma celulei reticulare; 3=mărire cu detaliere a imaginii din dreapta. *Dreapta:* rofeocitoză a feritinei la suprafaţa eritroblastului. Deasupra eritroblastului un macrofag încărcat cu hemosiderină. A=celulă reticulară cu conţinut de feritină; B=granule de fier; C=membrană nucleară; D=nucleu; 4, 5, 6 şi 7=vezicule de rofeocitoză în diferite stadii de încărcare cu granule de fier.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru stadiul ulterior de mobilizare a fierului de la suprafața celulară spre interior se pare că este necesară acțiunea unui sistem de enzime. Studii biochimice au arătat că în interiorul precursorilor eritrocitari fierul se găsește, atît sub formă ferică, cît și feroasă. Bessis și Breton-Gorius (56) au demonstrat, cu ajutorul microscopului electronic, schimbul de feritină între celulele reticulohisticitare (macrofage) și eritroblești. Deși acest fenomen nu poate fi apreciat cantitativ prin microscopia electronică, el are o mare importanță teoretică.

Pollycove sugerează că mișcarea fierului nu se face numai unilateral, de la celula macrofagă la eritroblești, ci și în sens invers, în cazurile în care există un exces de fier neheminic în aceștia. Nu este exclusă, cel puțin teoretic, nici posibilitatea unei scurt-circuitări a plasmei, în sensul că eritrocitele îmbătrînite ar putea transfera fierul direct eritroblaștilor.

2. FIERUL DE REZERVĂ

Aproximativ 1/4—1/3 din fierul total al organismului se află sub formă de fier de depozit în diferite organe. La femeie fierul de depozit este în cantitate mai mică decît la bărbați (200—400 mg față de aproximativ 1 000 mg). Cele mai mici cantități fiziologice de fier se găsesc la copilul mic între 6 luni și 2 ani.

Depozitarea fierului se face sub formă de feritină și hemosiderină, distribuite în proporții aproximativ egale. Fierul în exces, rezultat din distrucția eritrocitară sau din absorbția intestinală, este preluat și depus ca feritină în diverse organe, ca rezerve pentru „zile grele". Acești compuși sînt stocați, atît în celulele reticulo-histiocitare, cît și în cele parenchimatoase din diverse organe. Rezerva totală de fier a organismului este însă relativ mică, iar refacerea ei în caz de pierdere este anevoioasă. Fierul din depozite este suficient pentru a înlocui cel mult jumătate din totalul fierului sanguin (91, 139, 322).

a. Formele de depozitare a fierului

1) *Feritina* este o substanță incoloră, solubilă în apă, alcătuită dintr-un complex submicroscopic, neomogen, conținînd o parte metalică și una proteică. La microscopul electronic molecula de feritină apare formată din 4—6 mănunchiuri de particule dense (care nu reprezintă structura miceliilor de fier ci artefacte de tehnică).

Nucleul moleculei sau zona micelară este format din agregate coloidale de oxid de fier hidratat și fosforilat, cu următoarea compoziție probabilă: (Fe COH) 8 (Fe OPO_3H_2). Invelișul moleculei care înconjură zona micelară, ca un strat protector, este format din 20 de subunități polipeptidice cu structură identică (fig. 6-7) (25, 40). Prin tehnica colorației negative molecula de fier apare, la microscopul electronic sub aspectul ei real (fig. 6-8). Prin tehnici moderne s-a demonstrat că feritina ar avea o specificitate de organ.

Scanned with OKEN Scanner

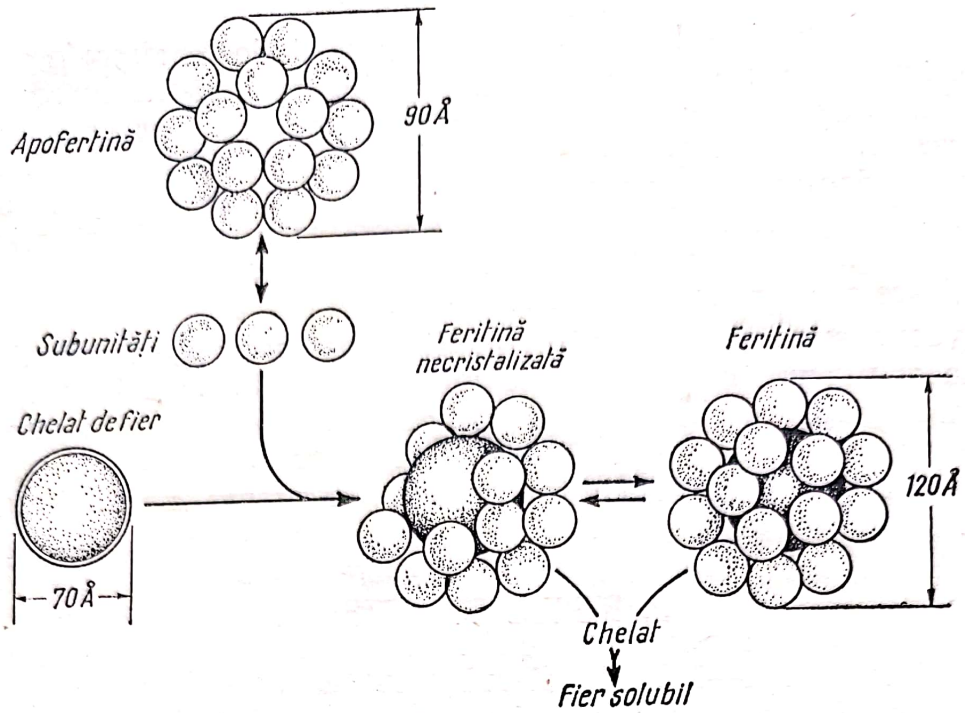


Fig. 6-7. Model schematic al structurii probabile a moleculei de feritină (după L. Pape, 1968).

Feritina este un compus alcătuit din micelii de fier și din apoferitină. Învelișul proteic (apoferitina) are o greutate moleculară de aproximativ 500 000, iar zona micelară, bogată în agregate coloidale de oxid de fier (circa 24 000 atomi de fier), ridică greutatea moleculară a feritinei la circa 1 000 000. Învelișul proteic este format din 20 de subunități polipeptidice identice, alcătuite din circa 200 de acizi aminați fiecare, cu o greutate moleculară de circa 25 000, aranjate sub formă de dodecadron pentagonal, cu un centru îngust între fiecare cinci fețe.

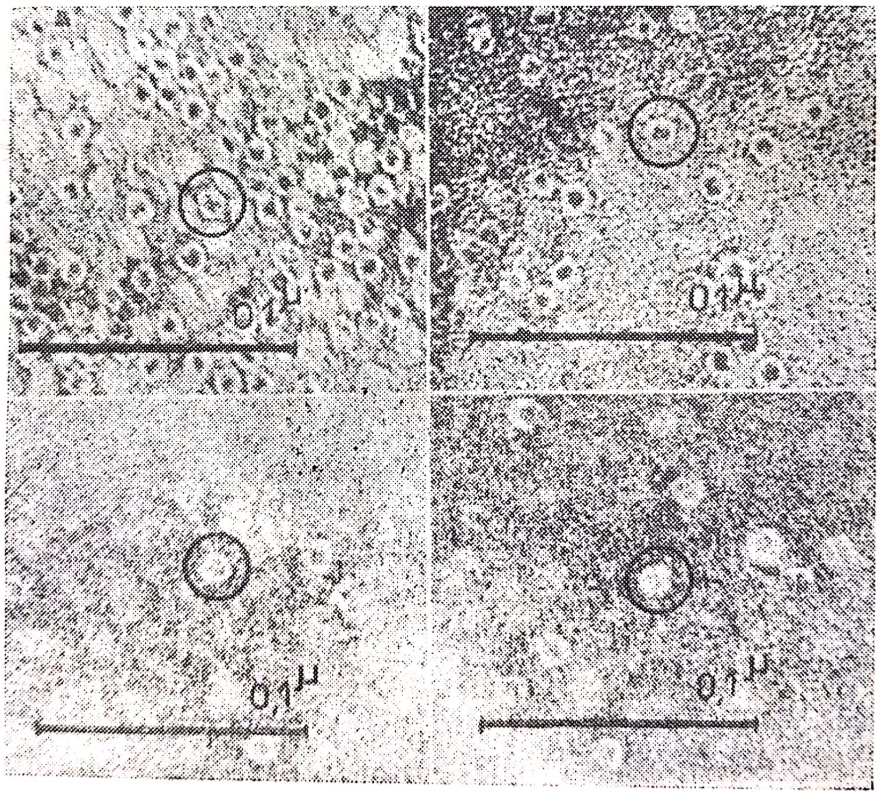


Fig. 6-8. Molecule de feritină examinate la microscopul electronic (după M. Bessis, 1973).

Moleculele de apoferitină învelesc, ca o coică, miceliile de fier care formează miezul moleculei de feritină. *Sus*, feritina este încărcată cu fier, *jos stînga*, încărcare slabă, iar *jos dreapta*, feritina este lipsită de fier (apoferitină) (microscopie electronică, mărire de 450×).

Prin diferite tehnici fierul poate fi extras din această metaloproteină; astfel, prin reducerea fierului trivalent în fier bivalent, cu ajutorul cisteinei, glutationului, acidului ascorbic, xantin-oxidazei etc., cele două componente moleculare pot fi separate fără alterarea demonstrabilă a învelișului proteic. Molecula de apoferitină apare astfel cu un centru cu configurație cavitară în care are loc acumularea de fier. Unul din chelatorii de fier, folosiți terapeutic în hemocromatoze este DTPA (dietilen-tetramin-penta-acetat), comercializat sub denumirea de desferal.

Distribuția feritinei în citoplasmă poate fi difuză sau sub formă de granule. Feritina este foarte răspîndită în organism; ea se găsește în celulele macrofage, histiocite, celulele epiteliului intestinal, celulele hepatice etc. În afară de mamifere, se întîlnește și la restul regnului animal, chiar și la animalele inferioare (moluște, viermi etc.). În condiții normale moleculele de feritină se grupează mai multe la un loc; ele pot fi considerate rezerve provizorii de fier (fig. 6-9). Cînd fierul feritinic este utilizat mai puțin rapid decît ritmul lui de formare, se acumulează sub formă de grămezi de fier, care, dacă ating un diametru de peste 0,2 μ, pot fi văzute la microscopul optic, la colorația cu albastru de Prusia (metoda Perls) (fig. 6-10).

2) *Hemosiderina* este a două formă de depozitare intracelulară a fierului. Termenul de hemosiderină este însă neadecvat; el a fost creat cînd s-a crezut că hemosiderina ar proveni din degradarea hemoglobinei. Hemosiderina este un constituent normal al multor țesuturi; granulele de hemosiderină sînt mai mari decît moleculele de feritină; ea se depune mai ales sub formă de agregate citoplasmatice bine delimitate, cu diametrul de 0,2—1 μ, denumite *siderozomi* ce pot fi văzute la microscopul optic la colorația cu albastru de Prusia la care apar de culoare albastru-verzuie. Conținutul de fier din molecula de hemosiderină este de circa 35% din reziduul uscat.

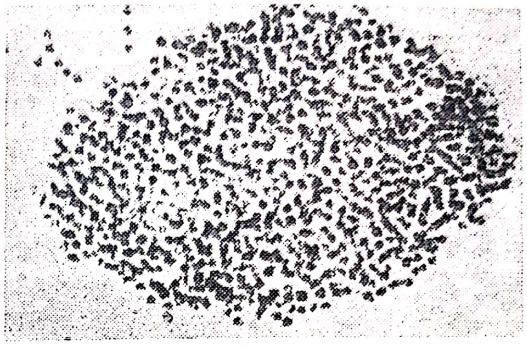


Fig. 6-9. Detaliu al unui siderozom într-un eritroblast normal (sideroblast). (mărire de 300 000×) (după M. Bessis, 1966).

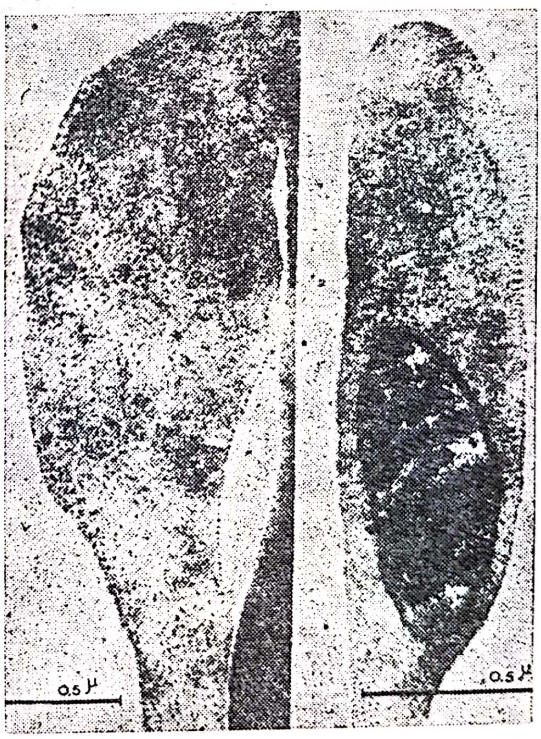


Fig. 6-10. Prezența fierului într-un eritrocit și un reticulocit (microscopie electronică după M. Bessis, 1963).

În stînga, eritrocit hipocrom ce conține fier nehemoglobinic (numeroase granule de feritină); la *dreapta*, un reticulocit în care se vede o mitocondrie puternic impregnată cu fier (siderozom).
(Caz de anemie hipocromă hipersideremică; funcția mitocondrială este alterată într-un astfel de caz). Un siderozom ca cel din dreapta poate fi văzut și la microscopul optic cu ajutorul colorației Perls.

Scanned with OKEN Scanner

Inițial s-a crezut că hemosiderina este un produs complet diferit de feritină. Studii efectuate la microscopul electronic, cu ajutorul difracției razelor X, a susceptibilității paramagnetice și a comportării antigenice, au lămurit diferențele și asemănările dintre feritină și hemosiderină. Astăzi este dovedit că hemosiderina derivă din feritină, fără să fie însă un produs omogen și bine structurat ca feritina. Hemosiderina se prezintă sub numeroase forme, atît din punct de vedere fizic, cît și chimic; ea se deosebește de feritină, în primul rînd, printr-o solubilitate în apă redusă sau nulă. Dacă se consideră formarea hemosiderinei tot ca un gen de polimerizare, ar fi de așteptat să aibă o compoziție chimică asemănătoare cu a feritinei, alcătuită din două componente: o parte proteică purtătoare, exterioară (aposiderina), și o parte micelară, internă. În timp ce apoferitina este o proteină diferențiată pentru depozitarea și mobilizarea rapidă a fierului, aposiderina este un produs celular mai puțin specific, care se formează prin depozitare intracitoplasmatică a unor combinații de fier anorganic și organic. Agregatele de hemosiderină sînt variabile în conținutul lor de fier, azot, proteine, lipide, glucide etc.; în compoziția lor au fost identificate și porfirine și alți pigmenți; toate aceste substanțe nu se găsesc la feritină. Fierul ar fi legat de un complex lipoproteic și de hidrați de carbon. Cu cît conținutul în proteine este mai redus, cu atît fierul este mai greu mobilizabil.

Invelișul proteic al feritinei poate fi denaturat încît fierul ajunge să fie acoperit de un fel de membrană care îl izolează în celulă; această membrană poate fi digerată enzimatic, iar fierul lipsit de protecția proteică, devine instabil și se polimerizează sau precipită formînd mase mari amorfe și neomogene de hemosiderină.

Astăzi este dovedit că hemosiderina nu este un corp inert, exclus din activitatea metabolică și care nu servește decît ca un simplu depozit de fier; s-a văzut că ea are un rol activ în formarea fierului heminic, chiar dacă nu este atît de ușor mobilizabilă ca feritina. În cazurile în care hemosiderina este nemobilizabilă („îmbătrînire" și mineralizare), bulgării mari de pigment sînt bine vizibili.

b. **Locurile de depozitare a fierului.** Principalele organe de depozitare ale fierului sînt măduva osoasă, ficatul și splina, care se deosebesc net de celelalte organe în ceea ce privește conținutul în fier.

1) *Măduva osoasă*, în dubla ei calitate, de organ eritroformator și organ de depozit, este organul cel mai important pentru metabolismul fierului. În măduvă coexistă alături două sectoare metabolice distincte ale feritinei: unul anabolic format din celulele eritroide și altul catabolic format din fierul celulelor macrofage și conjunctive, provenit din degradarea hemoglobinei (63). Măduva osoasă are o capacitate mai mare de a capta fierul decît alte țesuturi. În mod normal în măduvă se acumulează pînă la 80—90% din fierul ce intră în organism. La o saturație a transferinei de 30—50% măduvă „atrage" cantități importante de fier; dacă saturația de fier a transferinei este de peste 50%, fierul se depozitează în cantitate crescută și în alte țesuturi cu afinitate mai redusă pentru fier (24).

Scanned with OKEN Scanner

Eritroblaştii au posibilitatea de a fixa, pe suprafaţa lor, molecule de feritină pe care le înglobează în citoplasmă. Această cale foloseşte, în primul rînd, la revalorificarea fierului din eritrocitele fagocitate (117, 143, 159).

Evaluarea depozitelor de fier din măduva osoasă se poate face, atît pe frotiul obţinut prin puncţie aspiratoare, cît şi pe secţiuni histologice (în caz de puncţie biopsie); deşi este mai puţin comodă, ultima metodă este de preferat (143). Între cantitatea de fier din depozite, nivelele sanguine ale fierului plasmatic, a transferinei totale sau a hemoglobinei eritrocitare nu există, în toate cazurile, un paralelism care să permită concluzii reciproce. Astfel, depozitele de fier pot fi pline sau chiar supraplene, iar eliberarea lui să fie blocată (ca în infecţii şi tumori, dar mai ales în anemiile sideroacrestice), încît pot apărea o serie de semne clinice şi biologice comune cu cele din carenţa autentică de fier (ca de exemplu cele din hemoragiile cronice). În anemiile sideroacrestice afluxul de fier spre măduva osoasă fiind mult scăzut, fierul seric este crescut şi transferina plasmatică este saturată, ceea ce face ca cedarea fierului către

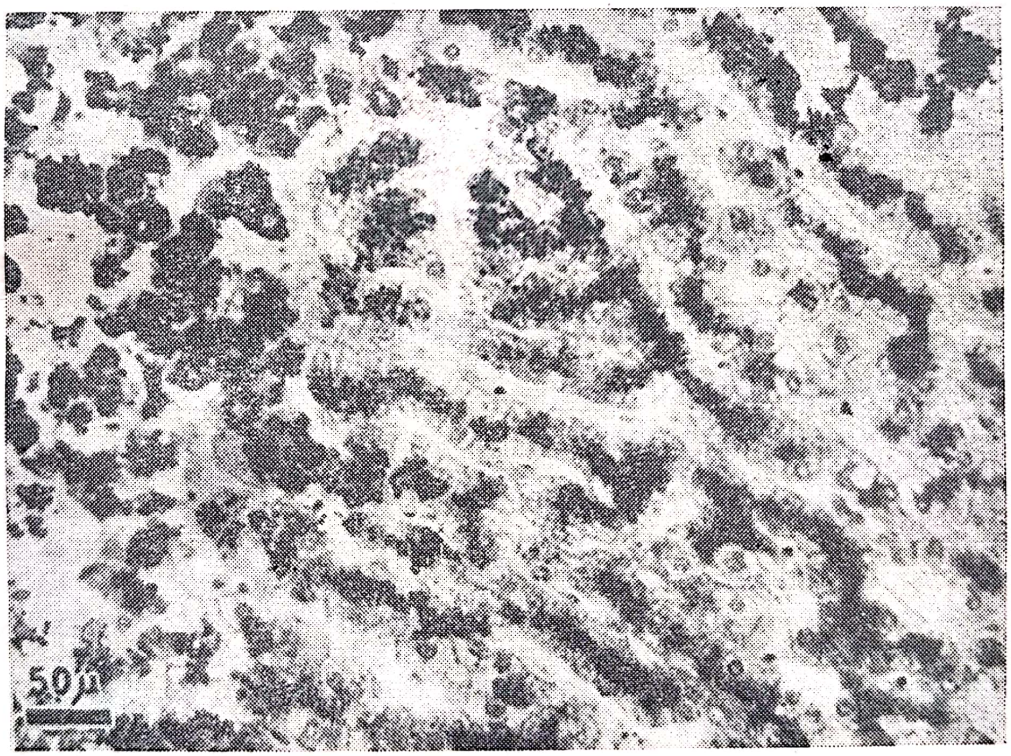


Fig. 6-11. Coloraţia fierului după metoda Perls (după J. Fruhling şi colab., 1968).
Se observă acumularea de fier la polul biliar al celulelor hepatice. În *stînga*, prezenţa de grămezi de fier în histiocite, în vecinătatea spaţiului port.

ţesuturile de tezaurizare să fie facilitată. De aceea tratamentul cu fier nu va fi recomandat înainte de explorarea fierului de depozit, pentru a se evita o şi mai mare încărcare a depozitelor.

În linii generale sideromacrofagele din alte organe se comportă identic cu cele din măduva osoasă. Uneori însă poate exista o depozitare prefe-

Scanned with OKEN Scanner

renţială în anumite organe; astfel în cazul atransferinemiei congenitale, depozitele medulare de fier sînt sărace în comparaţie cu sideroza excesivă din restul organismului. De asemenea, la bolnavii cu hemoglobinurie paroxistică nocturnă sau cu hemosideroză pulmonară poate lipsi uneori fierul colorabil din măduvă, în timp ce în rinichi, respectiv în plămîni, pot exista depozite considerabile de fier (143).

2) *Ficatul*, alt organ principal de depozit pentru fier, are, ca element particular, situaţia sa de „filtru" al substanţelor absorbite din intestin pe calea sanguină (fig. 6-11). În ceea ce priveşte fierul, este sigur că ficatul nu are nici un rol reglator al hematopoiezei prin influenţarea absorbţiei sau a circulaţiei acestuia. Cantitatea de fier hepatic creşte cu vîrsta: între 10 şi 20 de ani este de circa 200 mg, între 30 şi 40 de ani această cantitatea se dublează, pentru ca între 50 şi 60 de ani să ajungă la circa 500 mg.

3) *Splina* este un alt organ principal de depozitare a fierului. După splenectomie se semnalează o anemie cu scăderea fierului seric, precum şi o creştere a depozitului de fier din ficat. În splina omului normal se găsesc în medie 20 mg Fe (8).

Cantităţi mai mici de fier se găsesc în *plămîn, miocard, pancreas, rinichi* etc. (8).

Sideromacrofagele din măduva oaselor şi din alte organe sînt celule cu conţinut de fier decelabil prin reacţia Perls. Spre sideromacrofage pot să evolueze toate celulele „SRH" care posedă capacitatea de a fagocita. Cele mai active sideromacrofage sînt celulele sinusale marginale, histiocitele, celulele stromale, monocitele etc.

3. ENZIMELE NEHEMINICE (flavoproteinele)

Flavoproteinele sînt enzime feruginoase în care proteina este legată de fierul neheminic (metaloflavoproteine); ele au fost studiate mai aprofundat în ultimii ani; rolul lor enzimatic este dehidrogenarea. Cele mai importante flavoproteine sînt: NADH şi NADPH — citocromic reductaza (care protejează hemoglobina împotriva oxidării ei în methemoglobină), acid fumaric dehidrogenaza, succindehidrogenaza şi acid-CoA-dehidrogenaza (enzime aparţinînd ciclului Krebs), precum şi xantin-oxidaza, care fixează H^+ pe xantină şi pteroli.

Progresele viitoare ale enzimologiei vor permite, cu siguranţă, descoperirea şi altor flavo-enzime feruginoase.

II. APORTUL, ABSORBŢIA, CIRCULAŢIA ŞI ELIMINAREA FIERULUI DIN ORGANISM

Fierul din organism este, pînă la naştere, de origine maternă, iar ulterior de origine alimentară. În condiţiile patologice, în care există nevoi crescute de fier, acesta poate fi administrat pe cale medicamentoasă sau chiar prin transfuzii.

Scanned with OKEN Scanner

A. APORTUL DE FIER

Deşi în economia naturală fierul nu este socotit printre „metalele nobile“ (el reprezentînd 4,7% din masa scoarţei terestre); în organism însă, prin cantitatea mică în care se află şi mai ales prin importanţa rolului său şi minuţiozitatea cu care este drămuit, poate fi considerat ca atare (117).

1. CONŢINUTUL ÎN FIER AL ALIMENTELOR ŞI BĂUTURILOR

În alimente fierul există sub formă ionică, dar mai ales sub formă organică, în stare de complecşi ferici legaţi de proteine, de acizi organici sau de nuclei porfirinici (267).

a. **Conţinutul principalelor alimente în fier.** Pe primele locuri se situează sîngele, ficatul, măduva oaselor, splina şi rinichii; carnea are un conţinut de fier apropiat de al acestora, datorită mai ales mioglobinei pe care o conţine şi reziduilor de sînge; carnea de vacă este mai bogată în fier decît cea de pasăre (1,5—2,5 mg%) sau cea de peşte (0,5—1,2 mg%). Cantitatea de fier din celelalte viscere este mult mai mică. O altă sursă de fier o reprezintă gălbenuşul de ou; vegetalele şi fructele au un conţinut foarte inegal de fier: lintea cu 7,6 mg%, caisele cu 4, spanacul cu 3, făina de grîu cu 1, cartofii cu 0,60, orezul cu 0,50, piersicile cu 0,40, strugurii cu 0,30, merele cu 0,20 etc. Laptele, în special cel de vacă, are un conţinut scăzut de fier.

Locul de cultivare al vegetalelor comestibile influenţează cantitatea de fier, conţinută în ele, după cum solul este mai bogat sau mai sărac în acest metal.

b. **Fierul din diferite băuturi.** La calculul aportului alimentar de fier trebuie să se includă şi fierul conţinut în băuturi, ceea ce se neglijează adesea. Apa de fîntînă şi chiar de robinet poate conţine pînă la 5 mg de fier la litru, după compoziţia rocilor pe care le străbate. Băuturile alcoolice conţin, de asemenea, cantităţi variabile de fier (de exemplu, vinurile au un conţinut de fier determinat de provenienţa strugurilor) putînd varia între 1 şi 100 mg la litru.

c. **Influenţa recipientelor culinare asupra aportului alimentar de fier.** Cantitatea de fier ingerată prin alimente poate fi substanţial crescută prin prepararea acestora în anumite tipuri de vase; astfel, în cazul unei alimentaţii cu un conţinut intrinsec de circa 20 mg de fier pe zi, această cantitate poate ajunge la valori duble sau triple prin coacerea alimentelor în recipiente de fier (tigăi, ceaunuri). Aceste vase sînt mai răspîndite la populaţia săracă; utilizarea modernă a garniturilor de oţel inoxidabil sau a celor de aluminiu nu contribuie la suplimentarea, pe această cale, a fierului alimentar.

2. NEVOILE DE FIER ALE ORGANISMULUI

a. **Nevoile de fier la embrion şi la făt.** Nevoile de fier ale embrionului încep odată cu primele diviziuni celulare. La început predomină fierul heminic nehemoglobinic. Pe măsura dezvoltării circulaţiei, fierul

Scanned with OKEN Scanner

hemoglobinic cîştigă preponderenţa. Trecerea fierului de la mamă la făt nu se realizează prin simplă difuziune fizică ci prin mecanisme biologice mai complexe, deoarece la mamă există concentraţii mai mici de fier decît la făt. Distribuitorul de fier pentru embrion şi făt este tot transferina plasmatică a mamei care îl depune la nivelul placentei sub formă de feritină, de unde este preluat şi trecut în circulaţia fătului (228) (fig. 6-12).

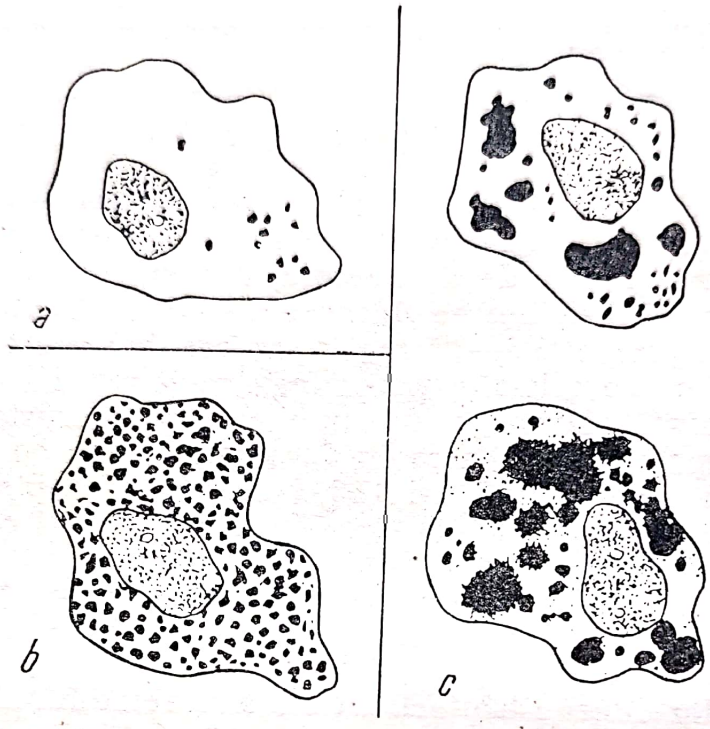


Fig. 6-12. Diferite forme de depozitare a fierului în celulele macrofage (sideromacrofage) (după Krauss şi Merker, 1964).

Particulele siderofile din macrofage pot avea dimensiuni diferite; în mod normal predomină particulele cu un diametru de 0,5—2 μ. Patologic, ele variază după tipul de maladie: în anemiile hemolitice sînt relativ mici; în aceste cazuri, fierul de depozit poate fi uşor mobilizat pentru a fi oferit eritropoiezei; în caz de anemie sideroacrestică, infecţii, tumori, hemocromatoză etc., fierul de depozit din macrofage este predominant sub forma unor aglomerate mari care pot atinge diametrul de 8 μ şi mai mult. Acest aspect de acumulare este mai greu mobilizabil, iar eritropoieza întîrzie, deşi fierul există în cantităţi crescute.

b. **Nevoile de fier după vîrstă şi sex.** Nou-născutul deţine o cantitate de fier mai mare decît cea necesară pentru nevoile fiziologice imediate (circa 350 mg); el acumulează astfel rezerve pentru perioada următoare, deoarece laptele pe care-l consumă în primele 4—5 luni de alimentaţie naturală exclusivă îi asigură un aport minim de fier, insuficient pentru nevoile unei creşteri rapide (dublarea greutăţii la sfîrşitul acestui interval).

Volumul sanguin al nou-născutului este de circa 250 ml, din care 150 ml sînt reprezentaţi de eritrocite (poliglobulie fiziologică cu hema-

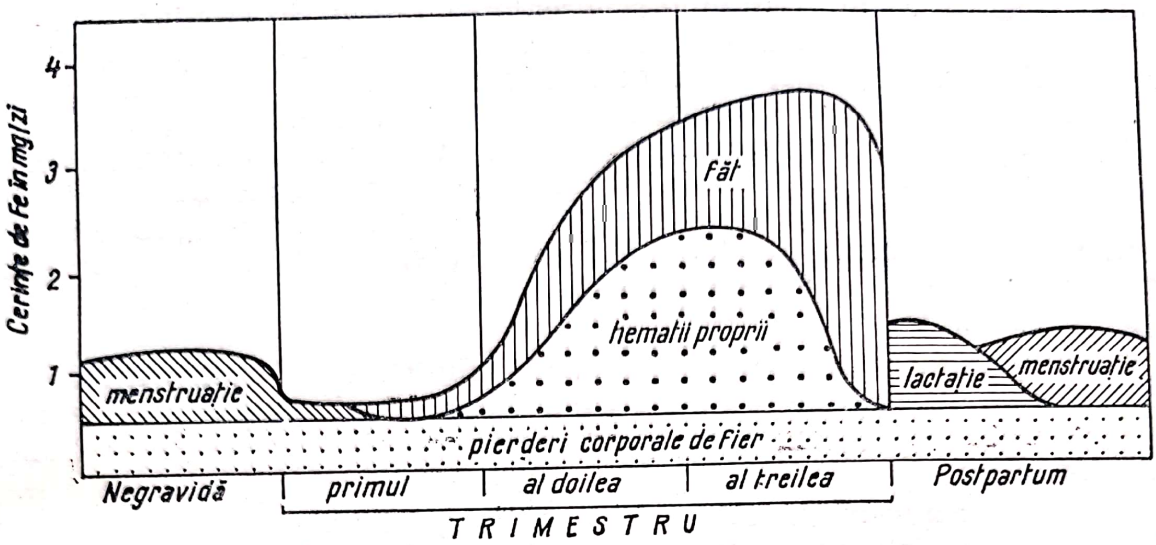


Fig. 6-13. Cerințele zilnice de fier pentru o femeie adultă înainte de sarcină, în cursul sarcinii și post partum (după Bothwell și Finch, 1962).

În grafic, necesitățile de fier sînt defalcate după destinație: menstruații, creșterea masei eritrocitare, dezvoltarea fătului, lactație.

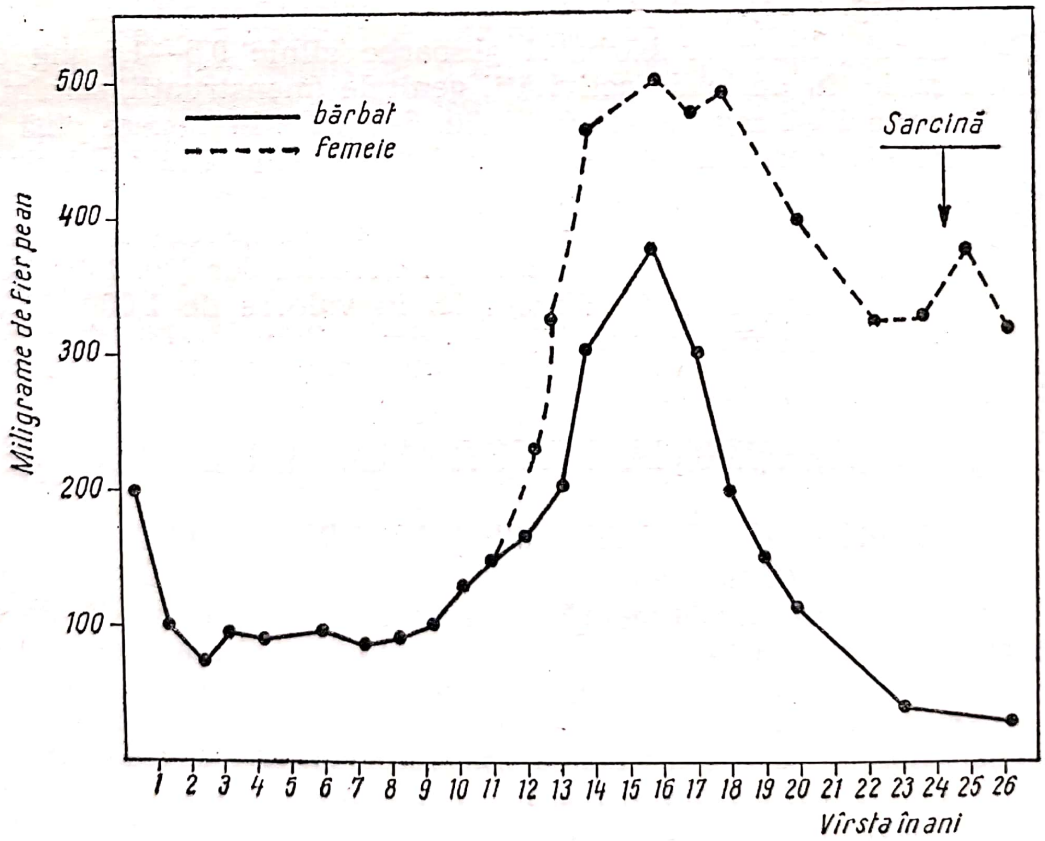


Fig. 6-14. Nevoile anuale de fier în funcție de vîrstă și sex (după Wintrobe, 1961).

Scanned with OKEN Scanner

tocrit pînă la 60%). Triplîndu-se greutatea fătului la sfîrșitul primului an, volumul sanguin crește și el de la 250 la 750 ml, însă în parte pe seama plasmei sanguine, deoarece hematocritul scade la 40%. Acoperirea diferenței de 150 mg de fier se face numai în parte din alimentație, restul provenind din depozitele moștenite de la mamă. Întîrzierea instituirii regimului mixt sau un regim neadecvat după vîrsta de 6 luni, ca și existența unui stoc insuficient de fier în depozite (mai ales dacă mama a suferit și ea de carență de fier), deși nu afectează volumul sanguin total, duce la scăderea masei eritrocitare (hematocrit 30—20%), deci la o anemie feriprivă, uneori accentuată.

Prin urmărirea fierului radioactiv, administrat femeii gravide, s-a constatat că în primele luni de viață fierul din hemoglobina sugarului este de origine maternă; la un an acest fier reprezintă 70%, iar la 2 ani— doar 40%.

Nevoile copilului în fier, raportate la greutatea corporală, sînt mai mari decît cele ale adultului, fapt explicat prin perioada de creștere, cu metabolismul ei activ. Pînă la pubertate absorbția de fier se face în ritm egal pentru ambele sexe. Odată cu instalarea menstruației apare un decalaj între nevoile de fier la cele două sexe, diferența fiind compensată, în cea mai mare parte, printr-o absorbție crescută de fier la fete. Cu toate acestea, între cele două sexe se menține totuși un anumit decalaj între nivelul de hemoglobină (14—16% la bărbat și 13—15% pentru femeie), (fig. 6-13).

Din fierul alimentar bărbatul absoarbe zilnic 0,5—1,5 mg de fier pe cînd femeia, în perioada activității genitale (menstruații, sarcini, alăptare), absoarbe 1—2 mg de fier (vezi fig. 6-14). De la naștere pînă la menopauză femeia necesită 12 g de fier, iar bărbatul, într-un interval de vîrstă corespunzător, numai 3 g. În ceea ce privește conținutul în fier, acesta nu trebuie să fie direct proporțional cu nevoile reale de fier, deoarece absorbția se adaptează cantitativ necesităților (20, 140). Se apreciază că într-o dietă variată, alimentele, în valoare de 1 000 de calorii, conțin aproximativ 6 mg de fier.

B. ABSORBȚIA INTESTINALĂ A FIERULUI

1. METODE DE MĂSURARE A ABSORBȚIEI FIERULUI

Pînă înainte de al doilea război mondial metoda uzuală de studiu a absorbției fierului a fost dozarea lui în alimente și măsurarea excreției prin materiile fecale. Acest precedeu pur chimic prezenta însă posibilități limitate de studiu. Odată cu introducerea în 1939 a izotopilor radioactivi în biologia experimentală, cu perfecționarea aparatelor de detectare și cu diversificarea produșilor biologici marcați radioactiv, datele obținute prin aceste metode s-au înmulțit considerabil. Tehnicile izotopice, spre deosebire de cele chimice, au avantajul că permit aprecierea absorbției și a fierului proteic, nu numai a celui ionic.

Scanned with OKEN Scanner

a. **Metode biochimice**

Proba hipersideremiei provocate a fost preconizată de Thoenes și Aschaffenburg în 1934 cu scopul de a urmări capacitatea de absorbție intestinală a fierului. Principiul este asemănător celui din hiperglicemia provocată. În timp ce în hiposideroză sideremia arată valori ridicate, în infecții, cu toată hiposideremia existentă, nu apare o hipersideremie la provocare (117).

b. **Metode izotopice.** Menționăm pe scurt cîteva din metodele cele mai uzuale care utilizează fier marcat radioactiv pentru cercetarea absorbției fierului și a repartizării lui după administrarea parenterală (29, 126, 143, 224).

1) Experimental s-a urmărit *absorbția fierului radioactiv* după introducerea lui la animale într-o ansă intestinală izolată, la un nivel mereu diferit al tractului gastro-intestinal. Deși metoda nu este fiziologică, a adus contribuții importante în anumite etape de cercetare.

2) Mora, Dubach (1956) și alți autori, pentru a urmări *circuitul fierului* în condiții cît mai fiziologice, au cultivat legume și zarzavaturi pe terenuri care conțineau fier marcat radioactiv sau au hrănit cu astfel de produse păsări care au fost consumate sub formă de carne, ouă, sînge; în felul acesta s-a putut urmări absorbția fierului în condiții mai complete decît sub forma fierului ionic.

3) Foarte răspîndită este *cercetarea absorbției fierului* cu ajutorul ^{59}Fe, administrat pe cale orală într-un preparat cu următorul conținut: 4 mg fier redus în 4 ml apă, 500 mg acid ascorbic și circa 1 mC ^{59}Fe sub formă de citrat feros și urmărite în scaun timp de cîteva zile. În medie, la un individ sănătos, se absoarbe circa 1/3 din fierul radioactiv administrat, dar rezultatele pot fi influențate de numeroși factori: forma chimică a compușilor de fier, cantitatea de fier radioactiv conținută în probă, starea anatomică și funcțională a tractului digestiv etc. (143).

4) *Administrarea unui izotop de fier* pe cale orală și *a altuia* pe cale i. v., ambii măsurîndu-se în același eșantion sanguin, într-un scintilator lichid dau posibilitatea diferențierii lor. Compararea separată a fierului încorporat în eritrocite, provenit din fierul injectat și al celui din fierul ingerat, permite evaluarea cantitativă a absorbției.

2. FACTORI FAVORIZANȚI ȘI INHIBITORI AI ABSORBȚIEI FIERULUI

În mod normal fierul are o anumită constantă de absorbție, care poate însă crește sau scădea în anumite limite, după nevoile organismului. Ca să poată fi absorbit, fierul trebuie să fie desprins din legăturile sale chimice din alimente și adus în forma redusă. Acest proces începe la nivelul stomacului și se continuă în intestin. Receptivitatea celulelor intestinale pentru fier diferă, în funcție, atît de factori exogeni, cît și de factori endogeni.

Scanned with OKEN Scanner

a. **Factori exogeni** (cu acţiune în lumentul tubului digestiv)

1) *Formele chimice ale fierului alimentar.* Cantitatea de fier ingerată întrece cu mult necesităţile fiziologice ale organismului; ea este departe de a fi absorbită în totalitate, chiar în cazurile în care nevoile de fier sînt foarte mari. Fierul este mai bine absorbit sub formă de sare feroasă decît ca sare ferică. După alţi autori, nu ar exista diferenţe între absorbţia fierului bivalent şi aceea a fierului trivalent, cu toate diferenţele foarte mari de solubilitate dintre acestea (262).

2) *Secreţiile digestive*

Acidul clorhidric este un factor favorizant al absorbţiei fierului alimentar; acest rol a fost supraestimat însă în trecut; acţiunea acidului clorhidric constă de fapt în scindarea alimentelor cu eliberarea fierului. În acest sens pledează constatarea că persoanele suferinde de aclorhidrie au o capacitate redusă de absorbţie a fierului. Unele experienţe au arătat că acidul clorhidric nici nu împiedică, nici nu măreşte absorbţia fierului, ci doar cuplul acid clorhidric-pepsină ar avea acţiune asupra absorbţiei fierului alimentar.

Pepsina ar contribui la punerea în libertate a fierului alimentar din legăturile lui cu proteinele, acţiune favorizată de mediul acid. În cazurile în care nu au loc pierderi de fier se poate asigura un stoc marţial normal şi la persoanele cu anaciditate; dacă au însă loc pierderi importante, persoanele cu anaciditate au o dificultate mai mare în a-şi compensa pierderile de fier şi ajung mai repede la anemie feriprivă decît persoanele cu secreţie gastrică normală. Persoanele cu gastrectomie sau cu atrofia mucoasei gastrice resorb din alimentaţie mai puţin fier decît cele sănătoase.

Gastroferina este o proteină descoperită în sucul gastric (1967), capabilă să lege fierul; rolul ei ar fi de prevenire a absorbţiei excesive a fierului (substanţă chelantă) (91).

Secreţia pancreatică inhibă absorbţia fierului, iar pancreatectomia experimentală sau legarea canalului Wirshung fac să crească absorbţia, chiar pînă la instalarea unei hemocromatoze. Aceeaşi observaţie s-a făcut şi în boala fibrochistică a pancreasului, în pancreatitele cronice etc., în care absorbţia fierului este crescută pînă la 3 ori valoarea normală. Observaţii asemănătoare s-au făcut şi în unele cazuri de ciroză hepatică (mai ales în cele de etiologie etilică), însă cele două stări de boală (insuficienţa exocrină a pancreasului şi ciroza hepatică) se asociază adesea şi nu se poate delimita în mod precis partea care revine fiecăreia în tulburarea absorbţiei fierului. Administrarea extractelor pancreatice diminuă absorbţia fierului în cazurile în care cele două organe sînt afectate. Deşi nu se cunoaşte modul de acţiune al pancreasului în limitarea absorbţiei fierului, există unele indicii că această acţiune ar ţine de funcţia pancreasului exocrin (272, 281, 315).

3) *Factori aduşi prin alimente.* Acidul ascorbic (administrat per os, nu şi parenteral), acidul succinic, inozina, cisteina şi altele, prin capacitatea lor reductoare, favorizează într-o măsură însemnată, absorbţia fierului. Fructoza favorizează absorbţia prin proprietatea ei de

Scanned with OKEN Scanner

a forma cu fierul chelaţi. Alcoolul favorizează şi el absorbţia fierului trivalent; el nu are efect în absorbţie în cazurile de aclorhidrie. Acizii aminaţi au un efect favorabil asupra absorbţiei fierului; acest efect nu este însă egal pentru toţi acizii aminaţi. Alimentele cu conţinut bogat de fosfaţi, fitaţi, carbonaţi etc. scad absorbţia fierului radioactiv, pe cînd alimentele cu conţinut scăzut în aceste săruri au un efect de stimulare a absorbţiei. Aceste substanţe ar forma cu fierul ionic precipitate insolubile; ele nu ar avea însă nici o acţiune asupra fierului hemoglobinic. Bicarbonaţii inhibă absorbţia favorizînd, probabil, polimerizarea nucleilor de hem.

b. **Factori endogeni.** Mecanismul celular al mucoasei intestinale, răspunzător de absorbţia fierului administrat în doze fiziologice, este sub dependenţa a trei factori endogeni: conţinutul organismului în fier, nivelul activităţii eritropoietice şi concentraţia de hemoglobină.

1) *Gradul de saturaţie a organismului cu fier.* Absorbţia fierului este influenţată de necesităţile organismului pentru acest metal şi mai puţin de cantitatea oferită. Creşterea cantităţii de fier administrate per os este însoţită de o scădere a proporţiei absorbite; astfel, dacă se administrează între 0,2 şi 0,5 mg Fe, absorbţia este de 90%, pe cînd din 5 mg de Fe administrat, absorbţia este doar de 10%. Sheila Callender (1959) constată că după o administrare la indivizi sănătoşi a unei cantităţi de 5 mg Fe hemoglobinic marcat, absorbţia a variat între 8 şi 70% de unde s-a tras concluzia că fierul se absoarbe după necesităţi. Supraîncărcarea cu fier (orală sau parenterală) deprimă absorbţia de 2—5 ori faţă de normal, iar sustragerea fierului prin regim carenţat o sporeşte de 2—5 ori.

2) *Activitatea eritropoietică.* Influenţa activităţii eritropoietice, independent de nivelul rezervelor de fier, se traduce prin creşterea, respectiv scăderea absorbţiei de fier. Hemoliza, hemoragiile, anoxia, injecţiile de cobalt, eritropoietina etc. produc o creştere a absorbţiei de fier de 1,5 pînă la 5 ori valorile fiziologice, după un interval de latenţă de circa 4 zile. În aceste condiţii absorbţia este independentă de sideremie sau de gradul de saturaţie a transferinei. Invers, poliglobulia posttransfuzională, hipoxia, aplazia medulară etc., duc constant la scăderea absorbţiei fierului de la 1,5 pînă la 10 ori sub valorile normale.

3) *Concentraţia hemoglobinei.* Rolul hemoglobinei a fost demonstrat experimental; la şoarecii aplaziaţi, a căror activitate eritropoietică este absentă, accentuarea anemiei prin hemoliză chimică sau imunologică duce la creşterea absorbţiei de fier, cu atît mai mult, cu cît hemoglobina ajunge la valori mai scăzute.

4) *Reglarea absorbţiei fierului.* Independent de factorii favorizanţi sau inhibanţi ai absorbţiei fierului, cantitatea de fier absorbită este determinată de nevoile de fier ale organismului şi este reglată de absorbţia intestinală a fierului. Cantitatea absorbită este în funcţie de stocul global de fier al organismului şi nu de vreunul din sectoarele marţiale privilegiate, mecanismul de informare avînd deci un caracter ubicuitar (267). În anemiile feriprive, consecutive hemoragiilor şi în anemiile hemolitice, în care măduva osoasă este stimulată, absorbţia de

Scanned with OKEN Scanner

fier este crescută, iar în cazurile în care se administrează transfuzii de sînge (urmate de reducerea hemoglobinogenezei) absorbția de fier scade (256, 267, 340, 341).

3. LOCUL ȘI MECANISMELE BIOCHIMICE ALE ABSORBȚIEI FIERULUI

Absorbția maximă a fierului se face la nivelul mucoasei duodenale. Totuși fierul se absoarbe de-a lungul întregului tract gastro-intestinal, dar în cantitate mai redusă decît la nivelul duodenului. Fierul marcat, introdus în stomacul animalelor cărora li s-a ligaturat pilorul, a fost găsit, la scurt timp, în sîngele acestora. Smith a constatat absorbție bună de fier la un bolnav cu rezecție gastrică și duodenală; Gajdos a găsit fierul marcat în plasma bolnavilor cărora li s-a introdus fier pe cale rectală prin clisme etc. (fig. 6—15).

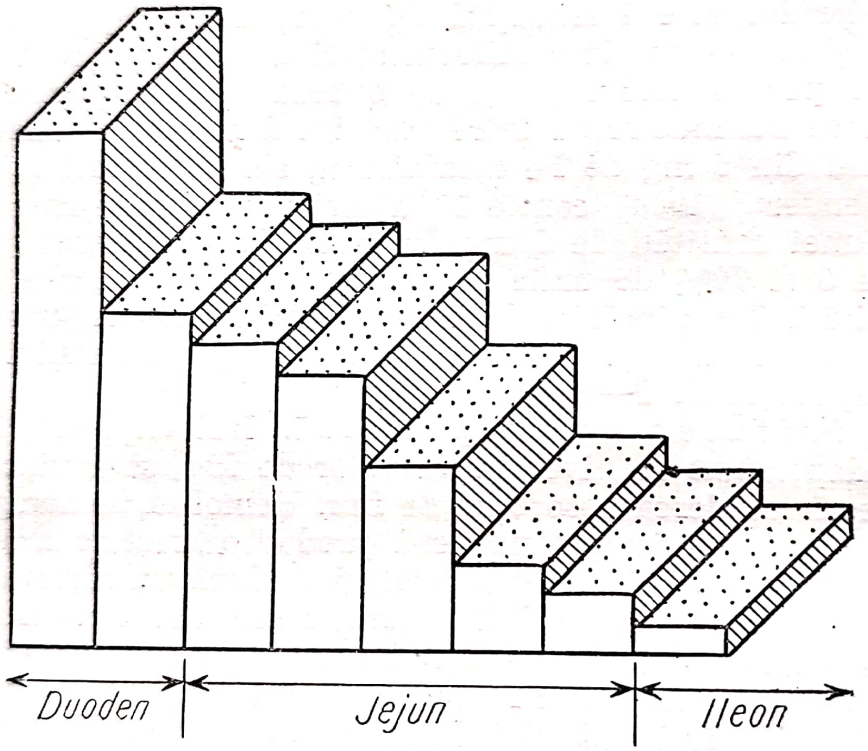


Fig. 6-15. Resorbția fierului în diverse segmente ale tractului gastro-intestinal (modificat după Brownn și Justus, 1958).

Absorbția fierului este maximală în prima porțiune a intestinului subțire și descrește progresiv, pe măsura distanțării alimentelor pe segmentele terminale, probabil urmare creșterii nivelului de săruri insolubile (fosfați, carbonați, fitați). Absorbția fierului la nivelul stomacului este neînsemnată (sub 1%).

Asimilarea fierului alimentar se face după nevoile organismului, utilizarea acestuia fiind legată, în primul rînd, de absorbția lui intestinală. Cu toate numeroasele cercetări efectuate, factorii care determină absorbția fierului nu sînt pe deplin explicați. Concepțiile care au căutat să lămurească mecanismul biochimic al acestui proces pot fi rezumate astfel:

a. **Concepția blocajului mucos** *(mucosal block)* a fost formulată de

Hahn și colab. în 1943. Acești autori au supus cîinii la sîngerări repetate pînă s-a ajuns la epuizarea rezervelor de fier, după care li s-a administrat fier per os. S-a constatat că în aceste condiții organismul animalelor era mai avid de fier absorbind o cantitate de 5 pînă la 10 ori mai mare decît la animalele martor; după un timp însă, absorbția diminuă. Această comportare a fost explicată prin existența în mucoasa intestinală a unui acceptor de fier (apoferitina), absorbția putîndu-se face pînă la saturarea acestei substanțe (care în combinație cu fierul devine feritină), după care încetează pînă la desaturarea unor noi cantități de apoferitină.

b. **Concepția difuzării pasive a fierului,** propusă de Granick în 1951, este o reluare a concepției blocajului mucos a lui Hahn. Acest autor, pe baza unor date experimentale, a constatat că în cantitate mică fierul alimentar se absoarbe în întregime, fiind transportat rapid, de la polul dinspre lumenul intestinal, spre polul vascular al celulei epiteliale parcurgînd alternativ cîteva treceri între formele feroasă și ferică. Pe măsură ce cantitatea de fier crește, difuziunea lui se face din ce în ce mai lent, pînă cînd resorbția lui este împiedicată total.

Atît concepția blocajului mucos a lui Hahm, cît și concepția difuziunii pasive a fierului emisă de Granick, au fost intens criticate în sînt abandonate astăzi, cel puțin în forma lor originară. Date experimentale, ulterioare, au arătat că administrarea fierului unui subiect cu deficit marțial duce, la început, la o creștere a absorbției, după care urmează o descreștere, fără să aibă loc totuși o sistare totală a penetrării lui în organism.

c. **Concepția excreției intestinale de fier.** Crosby (1963) și alții, bazați pe ultimele constatări, prin experiențele cu fier radioactiv, au emis o nouă concepție, după care mucoasa intestinală are, nu numai rolul de a absorbi fierul, ci și pe aceea de a elimina excesul de fier din organism; această eliminare interesează, nu numai fierul preluat de celule direct din lumenul intestinal, ci și excesul de fier endogen adus indirect prin intermediul plasmei și depus aici. Administrînd per os unui animal cantități mari de fier nemarcat și, concomitent, parenteral, fier radioactiv, se constată că mucoasa intestinală devine „burată" cu fier, iar fierul administrat per os nu se absoarbe. Prin autoradiografii s-a constatat că fierul marcat are tendința de a vehicula fierul endogen dinspre lumenul vascular spre cel intestinal, saturînd mucoasa intestinală și făcînd-o mai mult sau mai puțin refractară la intrarea fierului alimentar (fig. 6-16, 6-17) (85, 141).

Concepția macrofagică. Reglarea absorbției este explicată de autorii francezi (Mouriquant, Debray, Cattan etc.) prin date experimentale bazate pe tehnica histochimică a lui Perls. Autorii acordă histiocitelor (macrofagelor) din vilozitățile intestinale un rol primordial în metabolismul fierului. Aceste celule sînt capabile să se încarce cu fierul acumulat în celulele epiteliale, pe care îl livrează în mod progresiv sîngelui. De asemenea, histiocitele încărcate cu fier au capacitatea de a migra din profunzimea vilozităților, spre lumenul digestiv, avînd un rol excre-

Scanned with OKEN Scanner

tor activ, constituind o adevărată „placă turnantă" a metabolismului fierului. Ele ar capta fierul alimentar ca un burete, predîndu-l transferinei, sau l-ar prelua de la aceasta pentru a-l vărsa în lumenul intestinal; aceste celule ar conține, deci, atît fier hemoglobinic, cît și fier alimentar.

Această concepție atrăgătoare, bazată pe observații microscopice fine (putînd să deceleze pînă la 0,002 μg de fier), nu a primit încă confirmarea prin tehnici cu fier radioactiv, autoradiografice sau electronomicroscopice, cu totul necesare pentru control (217).

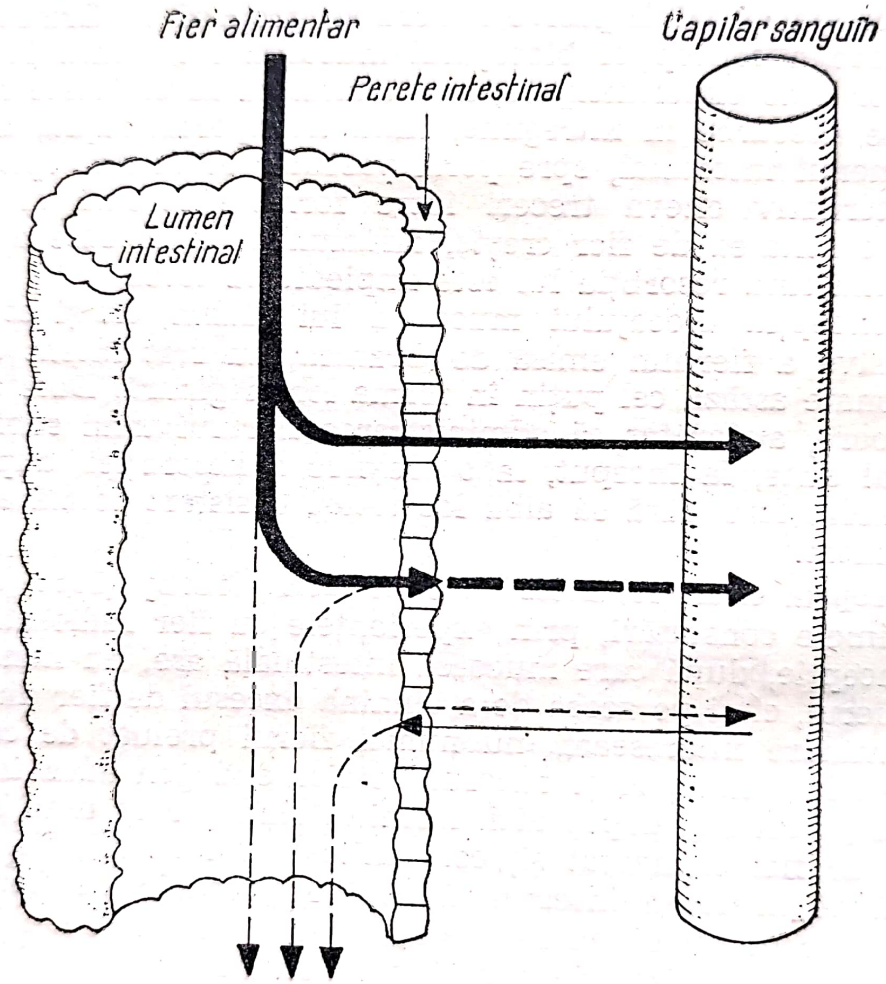


Fig. 6-16. Schema absorbției și excreției intestinale a fierului, propusă de Crosby (1963) și modificată după A. Gajdos (1967).

Absorbția fierului poate fi reglată, în anumite limite, de epiteliul intestinului subțire. Aici se formează acumulări de fier de unde este preluat, în cantitate mai mare sau mai mică, de către apoferitină, însă blocajul nu este niciodată complet chiar în cazul cînd se administrează doze suprafiziologice. Cînd nevoile sînt mai scăzute, celulele, ajunse la scadența duratei lor de viață, se descuamează și se elimină odată cu materiile fecale, pentru a feri organismul de supradozări de fier. Concepția „perdelei" de feritină (Crosby și alții, 1966), care are la bază numeroase argumente experimentale, pune în altă lumină concepția blocajului mucos formulată de Hahn (1943). De la nivelul epiteliului intestinal organismul se „autoservește" cu fier în funcție de doi factori de bază: cantitatea de fier disponibilă în organism și ritmul eritropoiezei.

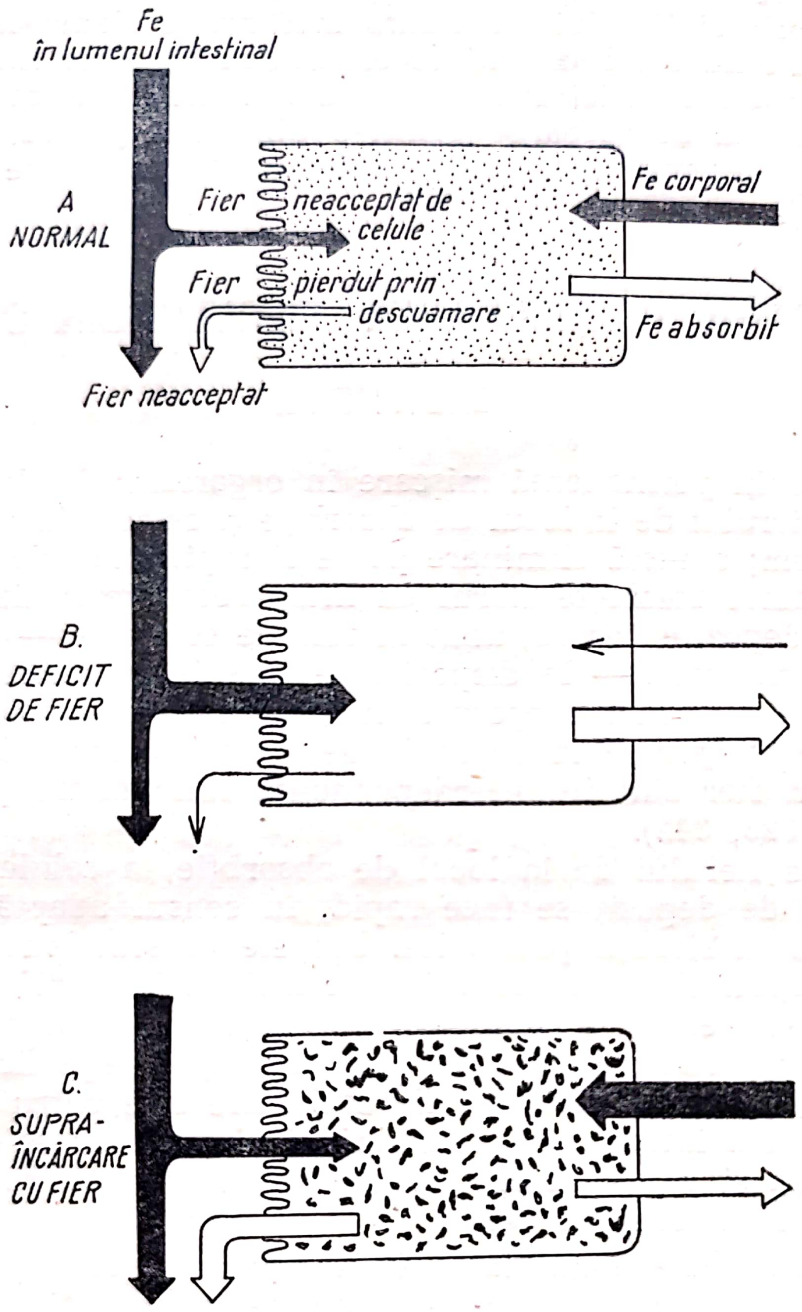


Fig. 6-17. Reglarea de către epiteliul intestinal a absorbţiei fierului (concepţia lui W. H. Crosby — 1963, exemplificată de M. Wintrobe, 1967).

În stare normală (A) mucoasa intestinală conţine Fe suplimentar, provenit din circulaţia sanguină, reducînd cantitatea de Fe ce poate fi absorbită din lumenul intestinal. Fierul din celulele epiteliului intestinal, neabsorbit în circulaţia sanguină, este pierdut prin descuamare la terminarea duratei de viaţă a acestor celule.

În deficitul de fier (B) nu există nici un baraj în calea intrării fierului în vilozităţile celulelor epiteliale şi nici nu este reţinut aici, el trecînd cu uşurinţă în sînge.

În stările de supraîncărcare cu Fe (C), Fe corporal este stocat în cantitate crescută în celulele epiteliale prin supraîncărcarea lor din plasmă, în timp ce absorbţia intestinală de Fe este inhibată; el este eliminat în cantităţi mari prin descuamarea epiteliului.

Scanned with OKEN Scanner

Cu toate cercetările întreprinse pentru a lămuri mecanismul biochimic al absorbţiei fierului, au rămas încă multe elemente nelămurite. Pînă în prezent nu s-a reuşit să se explice satisfăcător limitarea şi, în general, reglarea absorbţiei fierului după necesităţi. Se poate însă conchide că fierul nu se absoarbe printr-o difuziune pasivă, ci printr-un proces activ, soldat prin aport de energie, la care intervine şi un sistem enzimatic (117).

C. MIŞCAREA ŞI ELIMINAREA FIERULUI DIN ORGANISM

1. FEROKINETICA

Fierul este în permanentă mişcare în organism; ferokinetica începe cu preluarea fierului de la locul de absorbţie şi se termină cu eliminarea lui din organism; această eliminare poate fi rapidă sau de durată foarte lungă. Organismul foloseşte fierul cu multă economie; fierul neutilizat este stocat în depozite, iar cel aflat în funcţie este pus — după moartea celulelor consumatoare — la dispoziţia economiei generale, fiind distribuit, fie pentru o nouă încorporare în combinaţii care necesită fier, fie pentru stocare temporară în organele de depozit. Proteidele organismului care conţin fier sînt în interdependenţă funcţională (103, 113, 117, 141, 147, 213, 323, 342).

Deplasările fierului de la locul de absorbţie la celulele utilizatoare şi la organele de depozit se face rapid, în sensul adaptării la nevoile fiziologice, sau la situaţii patologice. Etapele acestui lanţ metabolic nu sînt încă pe deplin elucidate; se cunoaşte însă că între diferitele proteine acceptoare de fier există o competiţie inegală: unele, fiind mai avide de fier, îl leagă cu prioritate, pe cînd altele ajung să lege fierul abia după ce primele sînt saturate. Circuitul fierului între cele patru sectoare principale se face prin intermediul transferinei plasmatice; ea este distribuitorul care preia şi repartizează „cantităţile" de fier după nevoile compartimentelor respective (fig. 6-18).

Cu ajutorul ^{59}Fe s-au făcut investigaţii preţioase în legătură cu viteza şi intensitatea proceselor de absorbţie, transport, utilizare, tezaurizare şi excreţie. Explorarea eritropoiezei cu fier izotopic permite o apreciere cantitativă exactă a funcţiei sistemului eritropoietic deoarece fierul este utilizat, practic, numai în hemoglobinogeneză. Utilizarea lui în sinteza enzimelor heminice este, cantitativ, neglijabilă, iar fierul mioglobinic are o perioadă de reînnoire atît de lentă, încît participarea sa la schimburile de fier în organism este foarte redusă; excreţia naturală a fierului este şi ea infimă.

Efectuarea unei analize de ferokinetică necesită, în general, o doză de numai 5—10 microCi de ^{59}Fe (circa 0,3 μCi/kg), aşa încît echilibrul dinamic al fierului din organism nu este tulburat. Emiterea de raze γ puternice permite o bună detectare, chiar din afara organismului (explorări la suprafaţa corpului). Experimental pot fi utilizaţi concomitent doi

Scanned with OKEN Scanner

izotopi diferiţi ai fierului, izotopul 59 şi 55, administraţi pe cale diferită, „discriminarea" lor fiind posibilă cu ajutorul unui scintilator lichid (203).

Metoda cu ^{59}Fe pentru evaluarea eritropoiezei se continuă, cel mai frecvent, cu determinările izotopice ale ^{51}Co (folosit pentru evaluarea volumului eritrocitar şi a distrucţiei eritrocitare), deoarece ambii izotopi

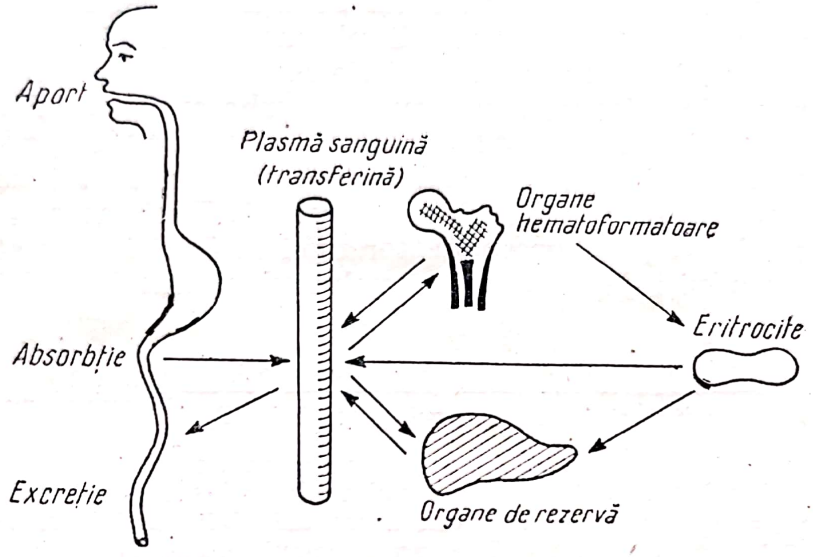


Fig. 6-18. **Reprezentare simplificată a ferokineticii.**
Distribuitorul principal al fierului în organism este transferina plasmatică; ea are rolul de a armoniza necesităţile variate ale diferitelor organe; în toate căile circuitului se interpune fierul plasmatic.

radioactivi, datorită energiilor lor γ diferite, pot fi sesizaţi cu aparate separatoare în mod concomitent, dar independent unul de altul (tehnica dublului marcaj) (153).

a. **Tehnica de explorare a eritropoiezei.** Izotopul de departe cel mai utilizat este ^{59}Fe, care are o perioadă de înjumătăţire de 45,1 zile, destul de lungă pentru a permite o explorare prelungită şi destul de scurtă pentru a nu reprezenta pericol pentru pacient. Tehnica a fost iniţiată de Finch (1949) şi Huff (1950), apoi îmbunătăţită de Sharney, Pollycove, Najean şi alţii.

Izotopul de fier injectat se leagă de proteina transportoare plasmatică (transferina) prin incubarea plasmei bolnavului timp de 20 de minute la 37°C cu o soluţie de $Cl_3{}^{59}Fe$ (clorură ferică). La indivizii a căror transferină este aproape în totalitate saturată, este de preferat o incubare cu plasmă normală. Pentru o explorare semicantitativă, prima măsurare se face la 15 minute. În primele 6—9 ore (în funcţie de diagnosticul prezumtiv) se fac aproximativ 6 măsurători ale radioactivităţii în probe de sînge. Durata urmăririi este de circa 14 zile; la început recoltările sînt zilnice, apoi la cîte 2 zile. Concomitent se determină hematocritul şi sideremia. La determinările în probe de sînge se adaugă măsurători externe pe ficat, splină şi sacru (sau stern); acest tip de măsurători, oricît ar fi de sensibile aparatele, nu ating gradul de exactitate al determinărilor pe sînge.

Scanned with OKEN Scanner

Un dezavantaj este faptul că în timpul explorării, care este de lungă durată, se cere ca bolnavul să fie într-o stare de stabilitate a masei sanguine (să nu sîngereze și să nu fie transfuzat), condiții greu sau imposibil de realizat în anumite situații (indivizi anemici la care nu se permite amînarea transfuziilor sau bolnavi care pierd sînge).

b. **Cercetarea activității plasmatice.** În minutele și orele care urmează injectării fierului marcat, legat de transferină, se constată o descreștere progresivă a radioactivității plasmatice. Dacă valorile obținute se înscriu, în funcție de timp, pe o hîrtie semilogaritmică, se obțin o serie de date ce pot fi înscrise pe două sau trei curbe exponențiale.

1) *Determinarea volumului plasmatic prin fier radioactiv.* La un individ normal, prima parte a curbei de descreștere plasmatică este reprezentată printr-o dreaptă. Dacă aceasta este extrapolată la timpul zero (T_0), corespunzător unei activități plasmatice de 100%, diluția eșantionului injectat exprimă volumul plasmatic (V.P.) în ml după formula:

$$\frac{\text{radioactivitatea totală injectată}}{\text{radioactivitatea a 1 ml plasmă la } T_0} = \text{V.P. în ml}$$

Față de valorile obținute cu albumină marcată cu ^{131}I, sau cu eritrocite marcate cu ^{51}Cr (și calcularea indirectă a volumului plasmatic), rezultatele obținute cu ^{59}Fe sînt superioare cu circa 10% din cauza difuzării parțiale a fierului în afara volumului plasmatic propriu-zis. Din acest calcul reiese că hemoglobina sintetizată zilnic ar fi de 1,2—2% din hemoglobina circulantă. Se știe că durata de viață medie a eritrocitelor este de 100—130 de zile, deci reînnoirea eritrocitară zilnică trebuie să fie de numai 0,80—1% din totalul masei circulante.

2) *Măsurarea descreșterii activității plasmatice.* Panta dreptei primei exponențiale exprimă viteza cu care fierul părăsește plasma, oferind prima informație asupra folosirii lui de către măduvă (301). Din această descreștere se pot calcula o serie de valori de ferokinetică, cum sînt *clearance*-ul și *turnover*-ul fierului plasmatic.

a) *Clearance-ul fierului plasmatic.* Exprimarea în minute a perioadei în care radioactivitatea plasmatică scade la jumătate ($T\,^1/_2$) permite calcularea *vitezei de reînnoire* a fierului plasmatic sau *clearance*-ul fierului plasmatic. În mod normal, în 70—180 de minute, jumătate din ^{59}Fe administrat părăsește plasma sanguină (fig. 6-19).

b) *Determinarea turnover-ului fierului plasmatic.* S-a văzut că fierul se găsește în plasmă într-o cantitate foarte redusă (circa 3 mg), deci într-o diluție de circa 1 : 1 000 000 în cei 3 litri de plasmă. Viteza de circulație a fierului fiind foarte mare, reînnoirea lui se face rapid.

Cantitatea de fier plasmatic ce părăsește plasma în 24 de ore reprezintă *turnover*-ul fierului plasmatic (TFP); el se poate calcula după următoarea formulă:

$$\text{TFP} = \frac{\text{sideremia} \times 0{,}693 \times 1\,440 \times 100\ \text{Ht}}{T_{50}\ (\text{în minute}) \times 1\,000 \times 100} = 30\text{—}40\ \text{mg}$$

$$\text{Sideremia} = \frac{\mu\text{g fier la 100 ml plasmă} \times 100\ \text{Ht}}{T_{50}\ (\text{în minute}) \times 100}$$

Scanned with OKEN Scanner

0,693 = logaritmul lui 2
1 440 = minutele dintr-o zi } (0,693 × 1 440 = circa 1 000)

T_{50} = jumătate din *clearance*-ul radioactivității
Ht = hematocritul
1 000 = cifra pentru convertirea sideremiei din μg în mg
Cele 2 valori de 1 000 de la numitor și numărător se anulează
TFP = 30—40 mg sau 0,45—0,65 mg/kg/zi; cu alte cuvinte reînnoirea (*turnover*-ul) fierului plasmatic se face de 8—10 ori pe zi (303).

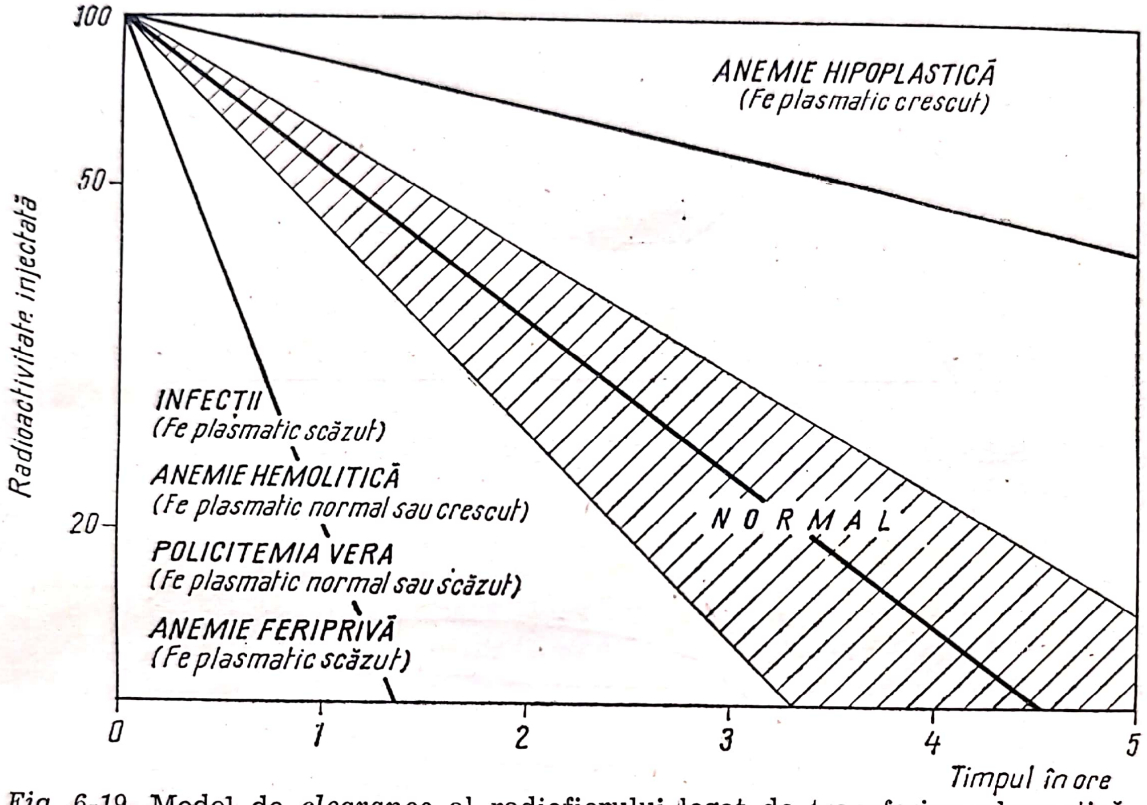


Fig. 6-19. Model de *clearance* al radiofierului legat de transferina plasmatică, în condiții normale și în diferite stări morbide (după T. H. Bothwell și colab., 1956).

În practică nu se urmărește dispariția fierului plasmatic, ci reducerea lui la jumătate (timp de înjumătățire sau T 1/2). *Clearance*-ul de 50% este de 90—150 de minute; prin extrapolare, dispariția de 99% este de 3—5 ore.

3) *Sectoarele fixe și labile de fier.* M. Pollycove și R. Y. Mortimer în 1961 au constatat că scăderea radioactivității fierului plasmatic nu urmează o linie semilogaritmică (dreaptă), ci o linie alcătuită din mai multe segmente corespunzînd mai multor ecuații exponențiale; cu ajutorul acestora, autorii au obținut valori care concordă cu parametrii duratei de viață eritrocitară. Ei explică acest aspect al curbei prin existența a două compartimente labile *(labile iron pool)*, intercalate, unul între plasma sanguină și organele de rezervă și altul între plasma sanguină și hemoglobina eritroblasto-eritrocitară. Prin intermediul acestora are loc un schimb continuu de fier între hemoglobină, plasma sanguină și organele de rezervă.

c. **Determinarea procesului de încorporare a fierului în eritrocitele circulante** arată o ascensiune progresivă a radioactivității, ce atinge un platou după 10—14 zile de la injectare (fig. 6-20 și 6-21). Proporția și

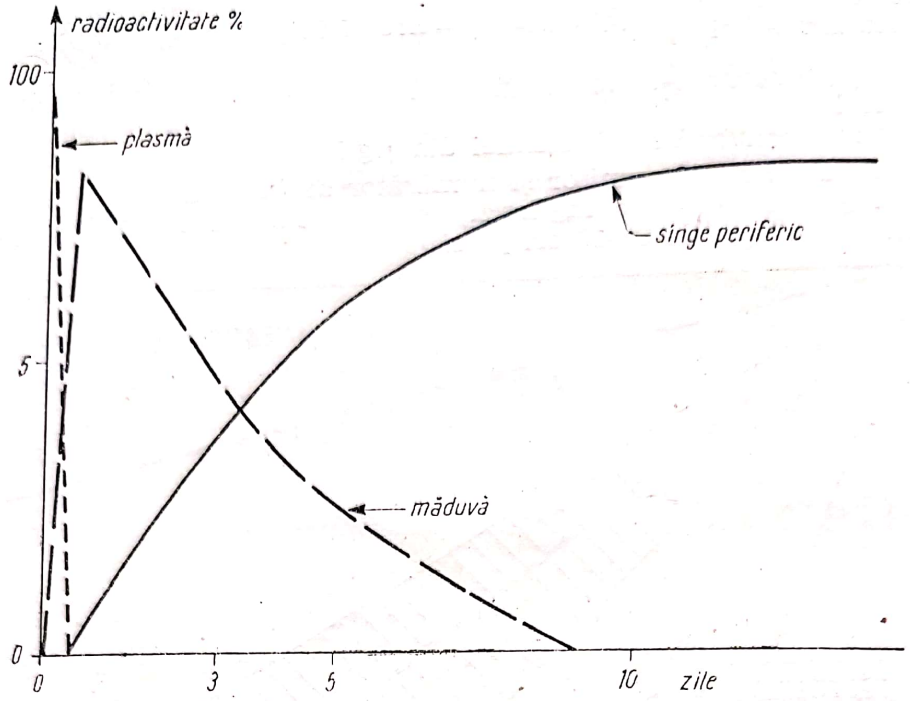


Fig. 6-20. Schemă reprezentînd dispariţia plasmatică a radiofierului, „captarea" lui din plasmă de către eritroblaştii medulari în curs de maturare şi ieşirea lui din măduvă cu eritrocitele tinere (după J. C. Healy, 1972).

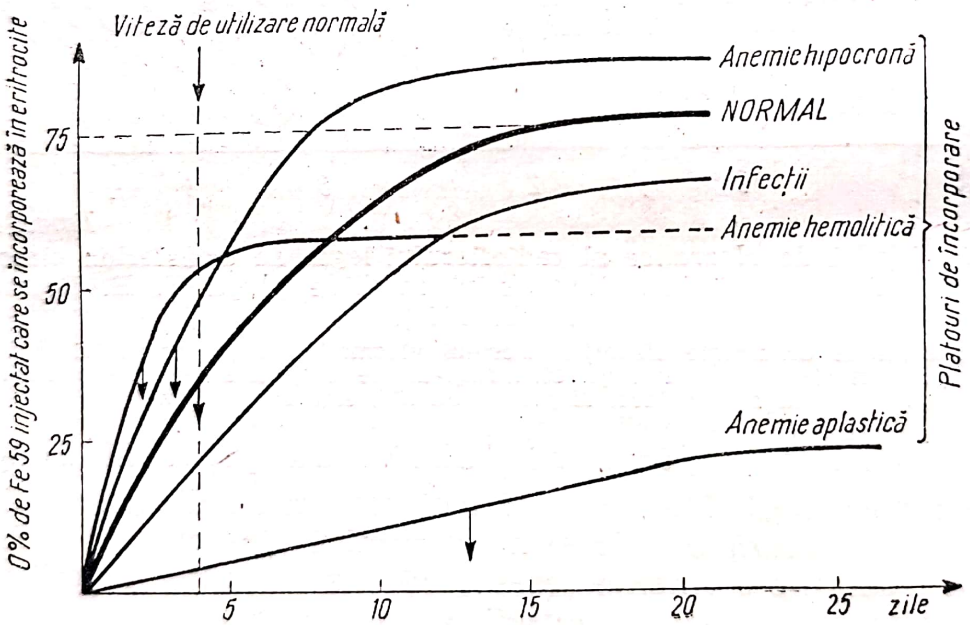


Fig. 6-21. Reapariţia radiofierului în eritrocitele circulante după administrarea lui enterală sau parenterală (după H. Pequignot, 1964).

La persoanele normale fierul radioactiv, injectat i.v., este atras în măduva eritroformatoare, iar în zilele următoare acest fier începe să părăsească măduva şi să fie reîntîlnit în eritrocitele circulante. Această curbă ascendentă atinge un platou prin ziua 8—10. În toate anemiile, cu excepţia anemiilor hipocrome, unde măduva este foarte avidă de Fe, procentul de utilizare este inferior celui normal. În anemiile hemolitice utilizarea este scăzută din cauza supraîncărcării cu fier a organismului, ceea ce duce la „diluarea" izotopului; aceeaşi situaţie apare şi în hemocromatoză. Viteza normală de utilizare a fierului (timpul de tranzit al fierului prin măduvă) este de 3—4 zile (săgeata pe linia punctată); ea reprezintă timpul necesar pentru încorporarea a 1/2 din *clearance*-ul plasmatic, raportat la 1/2 din radiofierul încorporat în eritrocite în ziua 10. Aceasta este accelerată (sub 3 zile) în anemiile hipocrome sau hemolitice (măduvă activă) şi încetinită în anemiile aplastice sau în cele de cauză infecţioasă.

viteza de încorporare a fierului în eritrocite se calculează din coeficientul de utilizare și din viteza de încorporare, după cum urmează:

1) *Coeficientul de încorporare eritrocitară* reprezintă procentul de radioactivitate găsit în circulație din cantitatea de radioactivitate injectată; el se calculează după formula:

$$\frac{\text{radioactivitate (ml} \times \text{volum sanguin} \times 100)}{\text{radioactivitate totală injectată}}$$; valorile normale sînt de 75—85%

Cele 15—25 de procente de fier radioactiv care rămîn neîncorporate în eritrocite sînt repartizate altor compuși feruginoși din organism, în cea mai mare parte în organele de depozit.

Creșterea coeficientului de utilizare a fierului este întîlnită în anemia feriprivă, unde valorile obținute sînt cuprinse între 90 și 100%, măduva avidă de fier folosind fierul administrat aproape în totalitate pentru eritropoieză.

Scăderea utilizării fierului apare în numeroase afecțiuni, ca anemii aplastice, hemocromatoză, anemii hemolitice, anemia pernicioasă, leucoze acute, după roentgenterapie, transfuzii de sînge, infecții etc., fără ca mecanismele de producere să fie identice.

2) *Viteza de încorporare a fierului* reprezintă timpul necesar pentru încorporarea a jumătate din doza administrată. În mod normal ea este de 3—4 zile și indică, cu aproximație, nivelul activității medulare. Acest timp este în raport cu viteza de maturație eritroblastică (care variază puțin în mod patologic) și de volumul compartimentelor neeritrocitare interpuse între fierul plasmatic și fierul din eritrocite (14, 28). Afecțiunile în care încorporarea fierului din eritrocite este modificată sînt redate în fig. 6-4.

Hiperfuncția medulară accelerează viteza de utilizare a fierului reducînd timpul de încorporare ($T\,^1/_2$) la circa 2 zile, cum este cazul în anemiile feriprive, anemiile hemolitice, anemia pernicioasă și chiar în unele leucemii. În anemia feriprivă nu are loc, practic, nici un schimb cu depozitele de fier care sînt mult scăzute, fierul administrat afluează în cantitate mare în măduvă. În anemiile posthemoragice acute are loc o creștere pronunțată a schimburilor, fierul trecînd din depozit în plasmă, iar de aici în măduvă, apoi în eritrocitele circulante. În anemiile hemolitice există o afluență mai crescută a fierului din plasmă către măduvă, iar de acolo în sîngele periferic și înapoi în măduvă. Un proces asemănător are loc în anemia pernicioasă, însă aici, datorită eritropoiezei ineficiente, o parte a fierului trece din măduvă înapoi în plasmă. În policitemie, corespunzător cu cantitatea crescută de eritrocite, există schimburi crescute între măduvă, plasmă și eritrocite.

În afecțiunile în care activitatea medulară este încetinită, ritmul de încorporare este și el scăzut. În anemiile hipoplastice trecerea către măduvă este mult scăzută, iar schimbul cu depozitele este crescut.

d. **Determinarea radioactivității la suprafața corpului.** La animalele de experiență activitatea metabolică a fierului la nivelul diferitelor or-

Scanned with OKEN Scanner

gane este ușor de apreciat prin sacrificarea lor, prelevarea organelor și efectuarea de măsurători asupra unui anumit fragment.

La om măsurarea activității la nivelul organelor se face prin sonde de scintilație cu cristal plin, al cărui con de detecție trebuie îndreptat totdeauna către același punct cutanat în tot decursul măsurătorilor. Activitatea eritrokineticii la nivelul oaselor (sacru, stern) sau al unor organe (splină, ficat), în comparație cu aceea a sîngelui circulant (aria precordială), furnizează date prețioase, deși doar de ordin semicantitativ. Activitatea măsurată la nivelul ficatului, splinei și a osului sacru trebuie să fie corectată în funcție de variațiile activității din sîngele circulant.

La nivelul oaselor se constată în mod normal o creștere a activității, care atinge maximum în ziua a 2-a după injecție; urmează o descreștere rapidă în cursul următoarelor 2—3 zile și devine apoi lentă pentru a dispare complet după circa 2 săptămîni. Curbele hepatice și splenice sînt de amplitudine mult mai slabă și se desfășoară în platou (vezi fig. 7-47).

În cazurile de insuficiență medulară curba de activitate înregistrată la nivelul oaselor prezintă o creștere ușoară, iar panta de coborîre este lentă, asemănătoare cu curba splenică și hepatică.

În caz de metaplazie mieloidă cu mielosclerozā se constată, pe de o parte o insuficiență a fixării fierului de măduvă, iar pe de altă parte o fixare mult mai importantă la nivelul splinei și eventual al ficatului.

Sechestrarea splenică a eritrocitelor cu distrugerea lor în acest organ poate fi și ea demonstrată prin măsurători de la suprafață. Măsurarea se face comparativ cu radioactivitatea circulantă, măsurată precardiac. Dacă splina nu deține o activitate hemolitică importantă, raportul splină-cord va fi redus (circa 1,5 în ziua a 30-a), iar în caz contrar raportul va ajunge la valoarea de 3 sau 4 la sfîrșitul primei săptămîni. Activitatea hemolitică a ficatului este și mai scăzută decît a splinei (301).

e. **Indicațiile probei cu fier 59.** Investigațiile de ferokinetică cu izotopi trebuie utilizate cu discernămînt, dat fiind durata lungă de urmărire, complexitatea probelor la care sînt supuși bolnavii și munca personalului care le efectuează. Dacă în unele afecțiuni informațiile pe care le pot oferi sînt deosebit de prețioase, în altele, aceleași rezultate se pot obține prin metode mult mai simple (103, 143, 234).

Indicațiile majore de aplicare a investigațiilor cu fier radioactiv sînt următoarele:

— insuficiențele medulare, în care prognosticul bolii este în raport cu gradul atingerii aparatului eritroblastic; aici *turnover*-ul fierului plasmatic este scăzut, iar rata de încorporare a fierului în eritrocite este și ea redusă; în măduvă nu se constată nici o creștere a radioactivității, iar cea de la nivelul depozitelor este crescută;

— hemocromatoza, unde aplicarea probei contribuie la diferențierea formelor primitive de cele secundare și la evaluarea cantitativă a depozitelor;

— anemiile cronice sideroblastice (refractare), în care cinetica fierului se comportă cu totul diferit;

— orice anemie în care explorările clasice nu au putut elucida cauza și mecanismul de producere.

Scanned with OKEN Scanner

Indicații relative în aplicarea ferokineticii sînt anemiile hemolitice în care proba cu ^{51}Cr aduce informații suficiente, anemiile hipocrome posthemoragice, în care mecanismul fiziopatologic este astăzi bine cunoscut și altele.

f. **Repartizarea fierului între diferite compartimente.** Existența unui compartiment labil în organele de rezervă a fost recunoscută încă de către Heilmeyer și colab. însă demonstrarea matematică — făcută de Pollycove și Mortimer — a existenței unui compartiment labil prehemoglobinic, a fost posibilă doar pe baza tehnicii izotopice perfecționate. S-a constatat astfel că fierul intrat în precursorii eritrocitari (eritroblești și reticulocite) este cantitativ superior celui utilizat pentru sinteza hemoglobinei; o fracțiune, care poate să se ridice la circa 1/3 din fierul intrat în eritroblești, ar reintra în plasma sanguină înainte de maturarea completă a eritrocitelor, dat fiind că acestea nu conțin fier neheminic (fig. 6-22).

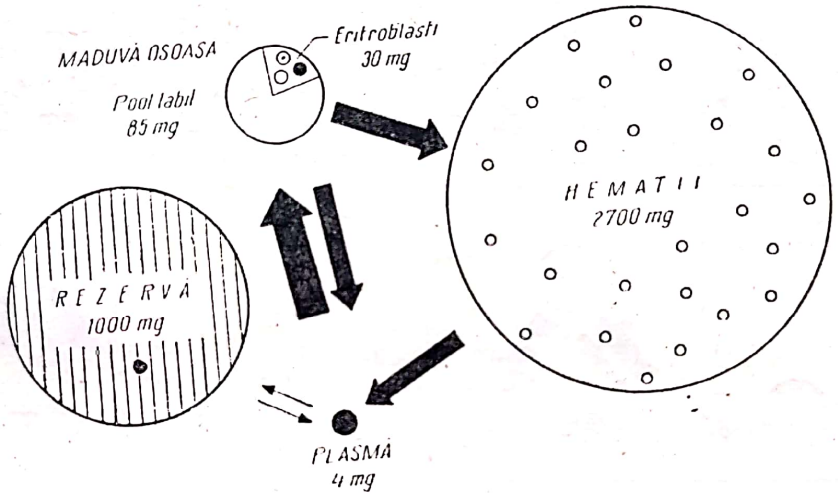


Fig. 6-22. Repartiția fierului între diversele compartimente în stare fiziologică (după M. Pollycove și R. Y. Mortimer, 1961).

Între toate compartimentele există un schimb continuu de fier: ritmul lui de mișcare variază de la organ la organ și chiar în cadrul aceluiași organ, în funcție de raportul dintre compartimentul fix și cel labil. Cea mai mare parte din fierul intrat în plasmă este furnizat de celulele macrofage care au fagocitat eritrocitele îmbătrînite (circa 25 mg); o cantitate incomparabil mai mică provine din organele de depozit (5 mg), din hemul enzimatic și prin absorbția intestinală (1 mg). Cea mai mare parte a fierului intrat în plasmă este redistribuit măduvei hematoformatoare (circa 25 mg) și numai o mică parte este dirijată spre organele de depozit (5 mg), metabolismului celular sau este excretată.

Tabelul 6-5

Bilanțul schimburilor fierului plasmatic
(după M. Pollycove și R. Y. Mortimer, 1961)

Fier ce părăsește plasma 40 mg/zi		Fier ce intră în plasmă, 40 mg/zi	
Depozit eritropoietic labil	37 mg	Eritrocite	23 mg/zi
Depozit	1 mg	Depozit	1 mg
Fluid extracelular	1 mg	Fluid extracelular	1 mg
Excreție și pierderi	1 mg	Absorbție	1 mg
		Depozit eritropoietic labil	14 mg

Scanned with OKEN Scanner

În tabelul 6-5 și fig. 6-23 este redat bilanțul zilnic al kineticii normale a fierului, plasma sanguină fiind locul de tranzit în toate direcțiile a fierului. Din cele circa 35 mg de Fe, 32 mg (91%) trec din plasmă în compartimentul labil eritropoietic, de unde se întorc iarăși în plasmă 11 mg (31%), în timp ce schimburile din plasmă și organele de rezervă se reduc la 1 mg (3%).

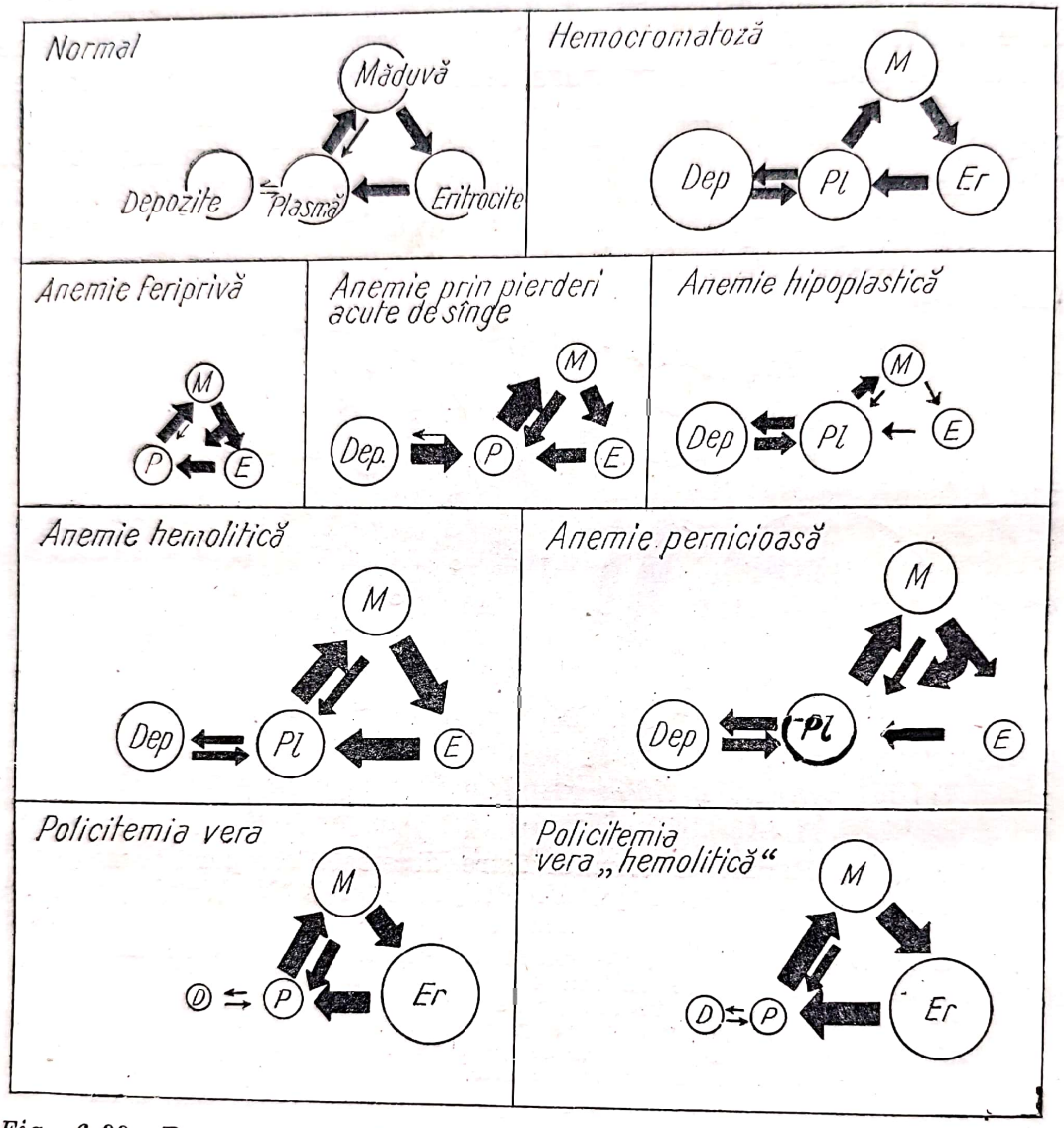


Fig. 6-23. Reprezentare figurativă a kineticii fierului în împrejurări fiziologice și patologice (după M. Pollycove, 1960, testul după H. Merker) (35).

Normal 70—90% din fierul absorbit în plasmă se îndreaptă spre măduvă, de acolo ajunge în sîngele periferic, iar după distrugerea acestora, revine în plasmă. În organele de depozit (ficat, splină), ajung doar cantități mici de fier. În *hemocromatoză* schimbul dintre fierul de depozit și plasmă este crescut. În *anemia feriprivă* schimburile cu depozitele de fier mult scăzute sînt minime. După *hemoragii acute* are loc o creștere pronunțată a schimburilor; fierul din depozite trece, în cantitate mare, în plasmă, iar de aici în măduvă și apoi în sîngele periferic ca eritrocite. În *anemiile hipoplastice* trecerea fierului spre măduvă este mult scăzută, iar schimbul cu depozitele este crescut. În *anemiile hemolitice* există o afluență mult crescută a fierului din plasmă spre măduvă, iar de acolo în sîngele periferic și iarăși înapoi la măduvă. Un proces asemănător are loc în *anemia pernicioasă* unde o parte a fierului, datorită eritropoiezei ineficiente, trece iarăși din măduvă în plasmă. În *policitemie* există schimburi crescute datorită cantității crescute de eritrocite.

2. CĂILE DE ELIMINARE A FIERULUI DIN ORGANISM

Fierul face parte din puţinele elemente care nu se excretă decît în cantităţi infime şi din această cauză s-a considerat pînă de curînd că circuitul fierului în organism are un sens unic, neexistînd organe specializate pentru excreţia lui. Bilanţul fierului ar fi deci, reglat, nu prin eliminări ci în primul rînd prin variaţii ale absorbţiei. Odată ajuns în organism, fierul este reţinut cu tenacitate, multă vreme. Finch (1959) a arătat că radiofierul injectat i.v. rămîne în organismul bărbatului circa 12 ani înainte de a dispărea complet; raţia lui de eliminare anuală este de circa 8%. La femeie, pierderea anuală dintr-o doză de radiofier injectată i.v. este de circa 20% (91, 99, 217).

Atît bărbatul cît şi femeia pierd cantităţi mici de fier prin descuamaţie celulară (epiderm, păr, unghii etc.); aceste cantităţi nu depăşesc însă 0,1—0,2 mg în 24 de ore. Dintre toate descuamările prin care se elimină fier, cea mai importantă este cea intestinală (cu circa 50 g celule epiteliale pe zi ducînd la o eliminare de 0,5 mg Fe în 24 de ore); fierul eliminat pe această cale s-a confundat mult timp cu fierul alimentar neabsorbit; celulele reticulo-endoteliale pot să migreze şi ele din vilozităţi spre lumenul intestinal (281). Fierul din scaun mai conţine cantităţi mici (5—28%) de fier provenit din excreţia biliară; în anemiile hemolitice, unde excreţia biliară este crescută, eliminarea fierului pe această cale este proporţional mai mare.

O mică parte a fierului din organism se pierde prin excreţie pe cale urinară şi prin transpiraţie. Pierderile prin transpiraţie sînt însă neînsemnate; doar în cele profuze se pot pierde cantităţi ceva mai ridicate de fier. Excreţia urinară este relativ redusă, chiar în cazurile în care sideremia este crescută, cu condiţia ca fierul prezent în plasmă să nu depăşească capacitatea de fixare a transferinei (eventualitate cu totul excepţională) (311, 314). Prin urină se mai pierde o cantitate de fier pe calea hematuriei microscopice fiziologice; leucocituria se însoţeşte şi ea de pierderi minime de fier; chiar şi proteinuria duce la mici pierderi prin fierul legat de proteine; de exemplu, în nefroze există o excreţie urinară de transferină, conţinutul plasmatic al acesteia scăzînd împreună cu celelalte proteine (103). În cazul cînd se fac injecţii cu fier, excreţia urinară de fier este mai mare decît în condiţii normale. Substanţele chelatoare pot mobiliza fierul din depozite, determinînd excreţia lui prin urină; s-au observat eliminări pînă la 80 mg zilnic.

Diferenţe legate de sex. Pierderile zilnice ale bărbatului sînt de 0,5—1 mg pe cînd cele ale femeii, care pierde sînge prin hemoragiile menstruale, sînt în medie de 1,0—1,5 mg; aceste pierderi sînt însă foarte variabile, 5—10% din femeile cu menstruaţie putînd să piardă o cantitate de sînge triplă faţă de valorile medii de circa 50 ml la 28 de zile.

Fiecare sarcină o „costă" pe femeie o pierdere medie de 600 mg de fier, în care intră fierul cedat de mamă fătului, fierul din placentă şi acela conţinut în sîngele cordonului ombilical, apoi fierul pierdut prin hemoragia de la naştere, pierderile de fier prin lohii, fierul pierdut prin lactaţie etc. Prin amenoreea gravidică şi postgravidică se recuperează

Scanned with OKEN Scanner

aproximativ 1/3 din fierul care s-ar fi pierdut prin menstruație (vezi tabelul 6-6).

Tabelul 6-6

Bilanțul fierului într-o sarcină

Pierderi de fier	
— produse de copil	200—400 mg
— prin placentă și cordonul ombilical	30—170 mg
— în timpul nașterii	100—250 mg
— prin alăptare (timp de 6 luni)	100—200 mg
Total pierderi	500—1 000 mg
Cîștig de fier	
— prin amenoree timp de 15 luni	200—500 mg

3. RECAPITULAREA CIFRICĂ A PRINCIPALELOR CONSTANTE SANGUINE CARE INTERFEREAZĂ CU METABOLISMUL FIERULUI

— un bărbat adult normal deține circa 4 000—6 000 ml de sînge, din care 2 400—2 800 ml sînt eritrocite (hematocrit 45%);

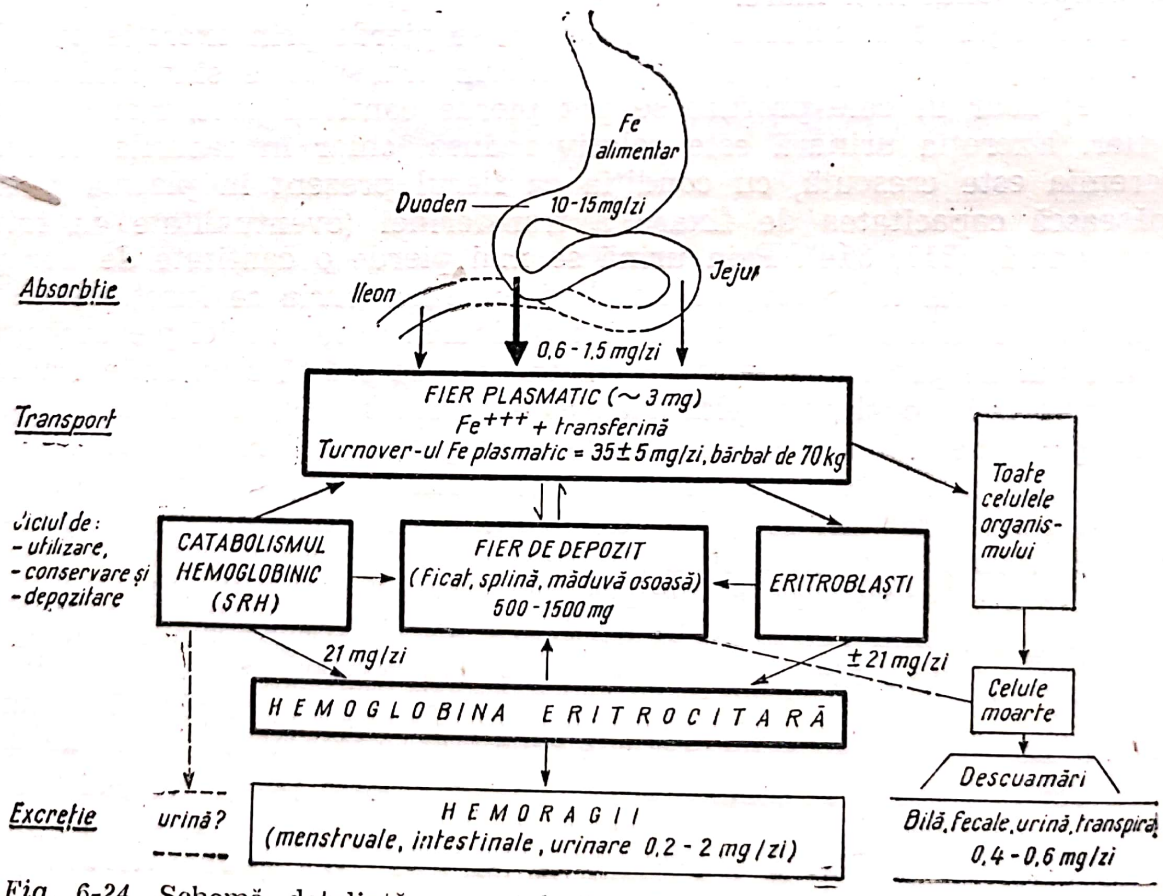


Fig. 6-24. Schemă detaliată a metabolismului fierului (după M. Wintrobe, 1967).

— 100 ml sînge conţin circa 16 g Hb; sîngele total conţine circa 800 g hemoglobină (1/3 din masa eritrocitară);

— un gram de hemoglobină conţine 3,4 mg fier, iar 100 g de sînge conţin circa 50 mg fier (0,5 g/l); întreaga hemoglobină circulantă conţine circa 2,5—3 g Fe (circa 2/3 din totalul fierului din organism);

— eritrocitele, care au o durată de viaţă de circa 120 de zile, pun în libertate zilnic circa 6,6 g Hb (800 : 120) care eliberează circa 22,5 mg fier; aceeaşi cantitate de fier se reutilizează prin resinteză eritrocitară;

— faţă de valorile mici ale absorbţiei şi excreţiei de fier (circa 1 mg pe zi), cifrele de mai sus arată că metabolismul fierului este dominat de degradarea şi sinteza hemoglobinei;

— plasma sanguină, cu un volum total de circa 3 000 ml, conţine aproximativ 10 g transferină, 300—400 mg la 100 ml plasmă, din care 1/3 este saturată cu fier; fierul plasmatic este în cantitate totală de aproximativ 4 mg, respectiv 120 g%;

— reînnoirea fierului plasmatic este de circa 32 mg în 24 ore de unde rezultă o înlocuire de circa 8 ori pe zi a întregii cantităţi de fier din plasmă (32 : 4) (fig. 6-24).

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 7

HEMOLIZA

Hemoliza se definește prin eliberarea hemoglobinei din interiorul eritrocitelor. Prin boală hemolitică se înțelege o stare morbidă în care durata de viață a eritrocitelor este redusă sub valorile normale. Boala hemolitică poate fi compensată cînd măduva hematopoietică, prin mărirea producției, înlocuiește pierderea excesivă de eritrocite, sau decompensată, cînd capacitatea ei de regenerare este depășită.

In vivo hemoliza corespunde distrugerii eritrocitelor, după care urmează „demontarea" lor în componentele din care au fost alcătuite și înlocuirea lor cu elemente tinere. Experimental se poate realiza golirea eritrocitelor de conținutul lor hemoglobinic, cu păstrarea — cel puțin temporară — a conținătorului (a stromei). Termenul de hemoliză nu este cel mai adecvat, cel de *eritroliză* ar fi mai potrivit, deoarece exprimă exclusiv distrucția eritrocitară globală, însă cel de hemoliză a ajuns să fie larg utilizat cu aceeași semnificație; el cuprinde atît hemoliza fiziologică, constînd în distrugerea eritrocitelor îmbătrînite, cît și hemoliza patologică al cărei mecanism de producere este foarte variat (24, 75, 99, 143, 171, 293, 300, 313, 337).

Unii autori (144) fac distincție între *„hemo-"* sau *„eritrocatereză"*, care este un proces hemolitic fiziologic și *„hemo-"* sau *„eritroliză"* care reprezintă distrucția crescută patologic.

I. DEZINTEGRAREA ERITROCITARĂ

Menținerea structurii chimice a hemoglobinei este în funcție de integritatea eritrocitului care îi asigură un „spațiu de protecție" împotriva degradării, membrana fiind suportul fizic al acestei integrități. Pentru îndeplinirea corectă a funcției de vehicul al hemoglobinei, eritrocitele trebuie să fie produse în cantitate suficientă, să fie calitativ normale și să li se asigure o ambianță de „bună vecinătate" cu mediul în care trăiesc. Echilibrul intrinsec și extrinsec al eritrocitului poate fi tulburat

Scanned with OKEN Scanner

de către factori multipli, dar chiar și în condiții perfect normale, eritrocitele ajung, de la o anumită vîrstă, la uzură. Globina se întoarce în rezervorul general de proteine al organismului, fierul este păstrat aproape în întregime sub formă de feritină intracelulară, de unde este reutilizat, în timp ce partea porfirinică este eliminată sub formă de substanțe bilirubinice. Durata de viață a hemoglobinei și a stromei, aflate într-o simbioză funcțională, este aproximativ egală.

Se apreciază, cu aproximație, că masa eritrocitară globală a unui adult normal cuprinde aproximativ 25 000 de miliarde de eritrocite. Dat fiind că durata medie de viață a unui eritrocit este de aproximativ 120 de zile, iar între formarea și distrucție există un echilibru perfect, reiese că zilnic se distrug circa 200 de miliarde de eritrocite, iar pe secundă circa 300 de milioane.

A. MECANISME DE HEMOLIZĂ *IN VITRO* ȘI *IN VIVO*

1. ALTERAREA ERITROCITARĂ FIZIOLOGICĂ

Nașterea, viața și moartea sînt stări inerente oricărui fenomen vital. La eritrocite, distrugerea survine după ce s-a ajuns la scadența impusă de „uzura" lor de circulație, dependentă de epuizarea lentă a rezervelor metabolice nerecuperabile, după care sînt înlocuite cu alte celule tinere; se poate deci spune că după circa 4 luni de viață eritrocitele mor „de bătrînețe".

Uzura eritrocitară in vivo. În cele 4 luni de viață în circulație eritrocitele sînt supuse multor „insulte" fizice și chimice. În fiecare minut eritrocitele trec de circa două ori printr-un capilar cu un diametru mai mic decît diametrul lor, unde sînt supuse unor acțiuni de compresie și deformare. În decursul existenței lor ele parcurg rapid, prin forța de propulsie a inimii, o distanță de 150—200 km, din care aproape jumătate prin teritorii înguste care le obligă la strangulări urmate de revenirea la forma lor inițială. O mare parte din existența lor eritrocitele o petrec în vasele sanguine cu structură sinusoidală unde stagnează ore întregi, fiind supuse unor controale fizico-biochimice de „verificare" a rezistenței lor; așa se întîmplă, de exemplu, în sinusurile splenice (terminate cu orificii înguste). În circulația sanguină eritrocitele sînt supuse alternativ, de mii de ori, la schimburi gazoase cu aerul alveolar și cu țesuturile și la atîtea alte schimburi ionice cu plasma sanguină.

Deformările și schimburile chimice nu pot continua indefinit fără consecințe, deoarece la menținerea structurii eritrocitare și la procesele biochimice amintite iau parte numeroase enzime care se uzează fără a putea fi înlocuite, unul din rezultatele senescenței fiind pierderea supleței eritrocitare. Odată pierdută capacitatea de transportor de oxigen, eritrocitul este fără valoare funcțională; devenind inutil, el sucombă, fiind apoi îndepărtat din circulație.

Eritrocitul fiind o celulă „simplificată", nu are capacitatea de a-și reînnoi toți factorii necesari metabolismului său. Deși alterările fizio-

Scanned with OKEN Scanner

logice se produc paralel, atît în membrană cît și în interiorul eritrocitului, rolul principal în distrucția eritrocitară îl au modificările biofizice și biochimice ale structurii membranei, care o fac mai susceptibilă la hemoliză.

1) *Modificări structurale și metabolice ale eritrocitului „îmbătrînit"*. În cursul îmbătrînirii eritrocitului apar multiple modificări fizico-chimice, care se pot rezuma astfel:

— creșterea fragilității osmotice și mecanice;

— scăderea conținutului în apă și, implicit, creșterea densității și scăderea volumului eritrocitar, cu scăderea în ansamblu a reziduului uscat;

— modificări ale membranei cu scăderea lipidelor și creșterea raportului lizolecitină/lecitină;

— creșterea conținutului de Na^+ și scăderea K^+ (consecutivă alterării „pompei ionice");

— scăderea glicolizei totale prin scăderea vitezei de consum a glucozei (și, prin aceasta, epuizarea rezervelor de ATP, cu scăderea raportului ATP/AMP, care, în jurul zilei a 90-a de viață, ajunge la o valoare de circa 20%);

— scăderea enzimelor căii oxidative a pentozei (și prin aceasta, scăderea glutationului redus și a grupărilor sulfidice, cu creșterea methemoglobinei și scăderea methemoglobin-reductazei).

Studiul modificărilor biochimice în eritrocite pe grupe separate de vîrstă este îngreuiat de heterogenitatea populației eritrocitare în eșantioanele de sînge. În anemiile hemolitice, unde numărul de reticulocite poate fi mult crescut, cercetarea enzimelor eritrocitare întîmpină dificultăți din cauză că reticulocitele au concentrații enzimatice mult mai ridicate decît populațiile adulte pe care le „contaminează" prin prezența lor. S-au făcut diverse tentative de separare a populațiilor reușindu-se să se obțină concentrate de eritrocite foarte tinere sau foarte vîrstnice. Prin sedimentare sau centrifugare diferențiată eritrocitele tinere, care au o densitate mai mică și un conținut mai mare de apă, rămîn mai la suprafață decît restul eritrocitelor.

Pe măsura îmbătrînirii eritrocitelor, atît componentele celulare structurale, cît și proprietățile și activitățile metabolice, se modifică în mod caracteristic.

Modificările proteinelor apar atît la nivelul hemoglobinei, cît și al proteinelor nehemoglobinice, în primul rînd al enzimelor; durata de viață a unui eritrocit este egală cu a proteinelor sale. Hemoglobina, ca și celelalte proteine, neputîndu-se reînnoi prin noi sinteze, se uzează în cursul vieții eritrocitului; în hemoglobina îmbătrînită (Hb A_3), curba de saturare cu O_2 devine din ce în ce mai scăzută în comparație cu Hb A. Același lucru este valabil și pentru proteinele enzimatice; în cursul îmbătrînirii eritrocitare se ajunge la alterarea activităților catalitice. Scăderea activității enzimatice este cauza activității scăzute a eritrocitelor îmbătrînite: scăderea cotei de glicoliză, scăderea activității ciclului pentoză-fosfat etc., ceea ce face ca eritrocitul să ajungă într-o stare de „insuficiență" (creșterea concentrației de MetHb, alterarea pompei de Na etc.). Denaturarea oxidativă a globinei devine manifestă pin precipitarea Hb sub formă de corpi Heinz (143).

Modificări ale lipidelor, atît cantitative cît și calitative, au fost, de asemenea, constatate. Faptul că suprafața eritrocitelor tinere este semnificativ mai mare decît a celulelor îmbătrînite se datorește și scăderii conținutului în lipide al eritrocitelor. De remarcat este scăderea colesterolului și a fosfolipidelor, dar și o modificare calitativă a fosfatidelor, ceea ce are repercusiuni asupra transportului activ prin membrană și, deci, asupra factorului hemoliză. O atenție deosebită în studiul îmbătrînirii eritrocitare a fost acordată raportului lizofosfatide/fosfatide (lizoleci-

Scanned with OKEN Scanner

tine/lecitine). Circulația fosfatidelor între lipidele plasmatice și cele eritrocitare are loc în sensul unui influx permanent de lizofosfatide în membrana eritrocitară, deoarece încorporarea acestora este preferențială față de a fosfatidelor. Incorporarea lizofosfatidelor (lizolecitinei) și acilarea lor în fosfatide necesită un travaliu celular activ, dependent de CoA și ATP și de unele enzime activatoare ale acizilor grași în procesul de transacilare (143).

2) *Uzura sîngelui conservat.* Sîngele conservat în condiții sterile, la frigider, nu poate fi utilizat decît timp de maximum trei săptămîni, deoarece apar unele alterări care îl fac ineficient și chiar nociv. În sîngele învechit apar, treptat, următoarele modificări care duc, în cele din urmă, la hemoliză: glucoza scade pînă la dispariție, rezervele de ATP se epuizează, K^+ părăsește eritrocitele.

Chiar înainte de a se produce hemoliza, eritrocitele din sîngele vechi sînt atît de fragile, încît, transfuzate unui primitor izogrup, sînt distruse, astfel că transfuzia devine ineficientă. Pentru prelungirea duratei de viață a eritrocitelor *in vitro* se cunosc mai multe metode, dintre care unele reduc nevoile metabolice, iar altele favorizează metabolismul eritrocitar; se utilizează astfel:

— păstrarea sîngelui la frigider (la +4°C) pentru reducerea metabolismului eritrocitar (măsură obligatorie);

— adăugarea unor soluții ușor acide (de exemplu soluția ACD (acid citric, citrat de sodiu și dextroză cu pH 5) sau CPD (citrat, fosfat, dextroză);

— adăugarea de glucoză, pentru a împrospăta rezervele energetice.

Nici aplicarea acestor măsuri nu poate asigura viabilitatea sîngelui peste limita de 3 săptămîni. În scopul unei prelungiri mai îndelungate există alte măsuri care au depășit deja domeniul experimental:

— păstrarea sîngelui într-o soluție de glicerol în containere cu azot lichid, măsură care permite coborîrea temperaturii mediului la —185°C; în felul acesta se suprimă total metabolismul eritrocitar, sîngele putînd fi conservat indefinit, asigurîndu-se autotransfuzii ideale pacienților care necesită sînge la o dată îndepărtată;

— încercări de reconstituire a rezervelor de ATP prin adăugare de nucleozide (adenozină), întrucît ATP nu poate pătrunde în interiorul eritrocitului (143).

O incubare de scurtă durată a eritrocitelor (suspendate în ACD) cu adenozină are ca efect refacerea ATP, chiar după o conservare de 8 săptămîni. Prin aceasta este restabilită capacitatea de glicoliză, care în condiții standard se sistează după un interval de 3 săptămîni. Prin utilizarea unui amestec de inozină-adenină-guanozină (IAG) s-a obținut prelungirea timpului de supraviețuire la 50 de zile. (143, 307.)

Modificările din cursul conservării și cele prin îmbătrînirea fiziologică prezintă deosebiri calitative importante. În timp ce în procesul de îmbătrînire se instalează o scădere ireversibilă a enzimelor, în cazul conservării, pe primul plan stă inhibarea reversibilă a metabolismului, dependentă de temperatură. Factorul esențial pentru tulburările metabolice îl reprezintă pierderea de ATP, care dispare rapid în cursul conservării; scăderea ATP diminuă, în primul rînd, capacitatea de utilizare a glucozei

Scanned with OKEN Scanner

și o suspendă total în cele din urmă. Dacă acest proces nu este foarte accentuat el este totuși reversibil în cazul unei „încărcări" a eritrocitelor cu ATP prin incubarea cu nucleozide, ceea ce dovedește că, spre deosebire de îmbătrînire, în conservare nu se produce o pierdere ireversibilă de enzime. Prin incubare cu nucleozide se poate reface capacitatea de glicoliză, chiar și în eritrocitele în vîrstă pînă la 120 de zile (143).

2. MECANISME EXPERIMENTALE DE HEMOLIZĂ

Dezintegrarea eritrocitelor *in vitro* se poate produce prin procedee fizice, mecanice, chimice și imunologice: liza coloid-osmotică (cu transformarea prealabilă a eritrocitului în sferocit sau echinocit), perforarea membranei eritrocitare (cu expulzarea din interior a macromoleculelor), prin fragmentarea eritrocitară (cu formare de schizocite) etc.

a. **Liza coloidosmotică.** Membrana eritrocitară nu reprezintă o simplă barieră fizică semipermeabilă, ci un constituent viu al citoplasmei, cu o structură specializată care-i asigură integritatea funcțională și posibilitatea de a comunica cu mediul exterior în conformitate cu nevoile metabolice celulare. Porii membranei nu permit exodul moleculelor mari din mediul intracelular (hemoglobină, enzime, produși metabolici intermediari). Membrana are capacitatea de a regla fluxul de cationi în contra gradientului osmotic, prin mecanisme care necesită însă consumul unor cantități de energie furnizate, în principal, de ciclul enzimatic glicolitic prin intermediul ATP și al ATP-azei (99, 337), exemplul cel mai elocvent fiind microsferocitoza ereditară.

In vitro acest tip de hemoliză poate fi indus prin suspendarea eritrocitelor în soluție hipotonă (fig. 7-1). Creșterea permeabilității membranei are ca primă consecință o penetrare a cationilor de Na, fără să se schimbe la început concentrația hemoglobinei și a altor macromolecule din interiorul eritrocitelor. Ca urmare a creșterii presiunii osmotice apa pătrunde în eritrocit rezultînd umflarea acestuia cu distensia porilor, după care urmează liza osmotică. Prin porii dilatați macromoleculele (între care însăși hemoglobina) părăsesc eritrocitul. În hemolizele de tip osmotic membrana nu este ruptă ci suferă doar o întindere, în general reversibilă, în urma căreia iau naștere orificii asemănătoare porilor; ele pot deveni însă suficient de mari (diametru de circa 6 mμ), pentru a lăsa să treacă și moleculele de proteină, în special cele de hemoglobină (143).

Hemoglobina poate fi îndepărtată și prin hemoliză blîndă (prin treceri succesive în soluții cu concentrații descrescînde). Se obține astfel o fantomă celulară cu forma apropiată de aceea a eritrocitului întreg, cu același diametru și conținut lipido-protidic, precum și cu unele proprietăți de permeabilitate (capacitatea de a concentra K^+ și de a expulza Na^+ în prezența ATP etc.). Cu toate că pentru exodul moleculelor de hemoglobină membrana trebuie să deschidă „ferestre" de circa 6 mμ, pe aceste fantome membrana mai rămîne, un anumit timp, puțin permeabilă pentru ionii de Na^+, al căror diametru, în stare hidratată, este doar de 0,5 mμ (137).

Scanned with OKEN Scanner

Unii agenţi prezenţi în circulaţie interferează cu însăşi funcţia membranei; astfel acţionează, de exemplu, plumbul, uleiurile etc., care denaturează proteinele membranei prin acţiune directă.

b. **Perforarea membranei eritrocitare.** Printre mecanismele care duc la distrugerea eritrocitului *in vitro* se descrie şi perforarea, de obicei unică, a membranei, fără ca restul învelişului eritrocitar neafectat să

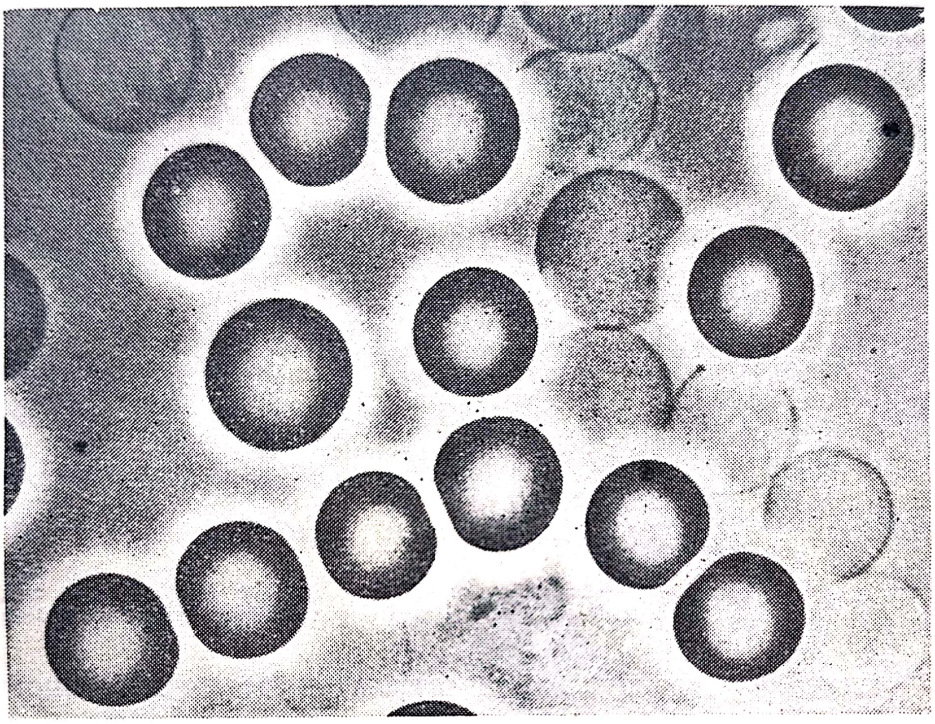


Fig. 7-1. Hemoliză indusă prin hipotonie (după M. Bessis, 1973). Eritrocitele devin iniţial sferice, apoi hemoglobina părăseşte lent spaţiul de protecţie (membrana), transformîndu-se în „fantome" eritrocitare (Microscopie în contrast de fază.)

poată apropia buzele „plăgii" create. Formarea de adevărate breşe în membrana eritrocitară duce la pierderea directă de hemoglobină fără să mai intervină o umflare prealabilă a eritrocitului prin mecanism osmotic.

În aceste cazuri orificiul creat trebuie să fie mai mare de 32,5 Å. Difuziunea hemoglobinei în afară nu poate fi împiedicată printr-o echilibrare osmotică din mediul exterior al eritrocitului, putînd fi doar atenuată parţial prin prezenţa moleculelor de dextran cu greutate moleculară ridicată, care sînt uneori în măsură să astupe aceste orificii.

Experimental au fost încercate diferite modele de perforare a eritrocitelor ca, de exemplu, cu corpuri ascuţite, raze ultraviolete, fascicule de laser etc., reuşindu-se expulzarea completă a hemoglobinei din interiorul lor (fig. 7-2). Dacă evacuarea ei se face brusc se imprimă eritrocitului o mişcare de recul care îl proiectează în sens opus, fenomen clar demonstrabil prin microcinematografie, dînd impresia de autopropulsie prin jet. Fenomenul nu apare cu aceeaşi intensitate la toate eritrocitele,

Scanned with OKEN Scanner

probabil din cauza tensiunii inegale din interiorul lor, precum și din cauza unor stări patologice.

În anumite împrejurări, cînd asupra membranei eritrocitare se aplică agenți fizici (fasciculul de raze ultraviolete, raze Laser* etc.) aceștia pot acționa ca adevărate „bisturie electrice", cicatrizînd plaga provocată, înainte ca eritrocitele să-și piardă întregul conținut, eritrocitele rămînînd

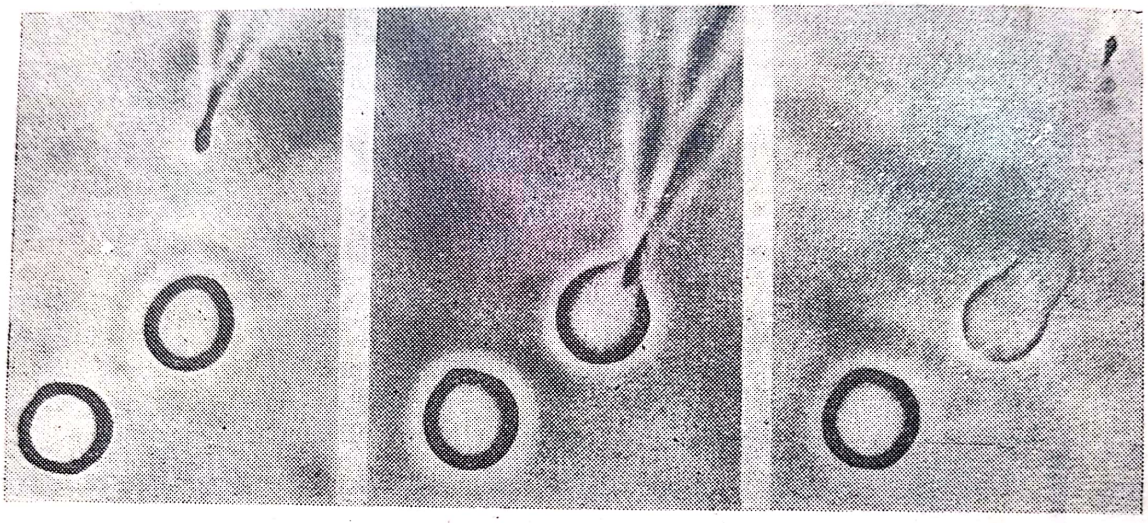


Fig. 7-2. Microchirurgie efectuată asupra unui eritrocit uman (după M. Bessis, 1966).

Microbisturiul este apropiat de eritrocit (stînga); este înțepat (mijloc), iar apoi este îndepărtat (dreapta sus) lăsînd o „fantomă" (dreapta mijloc). (Mărire 2 000×.)

tot restul vieții lor (de altfel foarte scurte) cu aceste vicii morfologice (fig. 7-3).

c. **Fragmentarea eritrocitară** reprezintă pierderi ale unor porțiuni de membrană care se reorganizează cavitar putînd să conțină, sau nu, hemoglobină; cînd fragmentele sînt mici, se pot desprinde din eritrocit în număr de 3 sau 4 fără să producă hemoliză. Rand (143) a arătat, cu ajutorul micropipetelor, că fragmentarea parțială a eritrocitelor se poate face de mai multe ori la rînd, de la mic la mai mic, schizocitele devenind din ce în ce mai sferice și mai fragile. Acest fenomen poate fi comparat cu mecanismul de formare a unor „baloane de săpun", situație în care, dacă se procedează blînd, se pot realiza vezicule fiice în număr mare. Intrucît cantitatea de membrană pierdută este mai mare decît pierderea de conținut intraeritrocitar, raportul suprafață/volum descrește, iar eritrocitul donator devine sferoidal. Acest fapt provoacă creșterea rigidității, respectiv diminuarea plasticității eritrocitelor, cu îngreunarea trecerii lor prin capilarele înguste, deși volumul lor este mai scăzut decît în mod normal. Ele pot rămîne astfel sechestrate, mai ales la nivelul splinei, de unde rezultă și o scurtare a duratei lor de viață.

---

* *Laser* = Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (amplificare a undelor luminoase cu degajare considerabilă de energie).

Scanned with OKEN Scanner

Alterarea eritrocitelor în urma condițiilor anormale de scurgere a sîngelui prin vase a fost urmărită prin mai multe modele experimentale. În experimentul cu înglobarea eritrocitelor într-o rețea de fibrină se realizează, în prima fază, o blocare a lor ca într-un năvod, iar în a doua fază presiunea exercitată asupra lor poate duce la secționări sau „încrestări" cu diferite degradări morfologice.

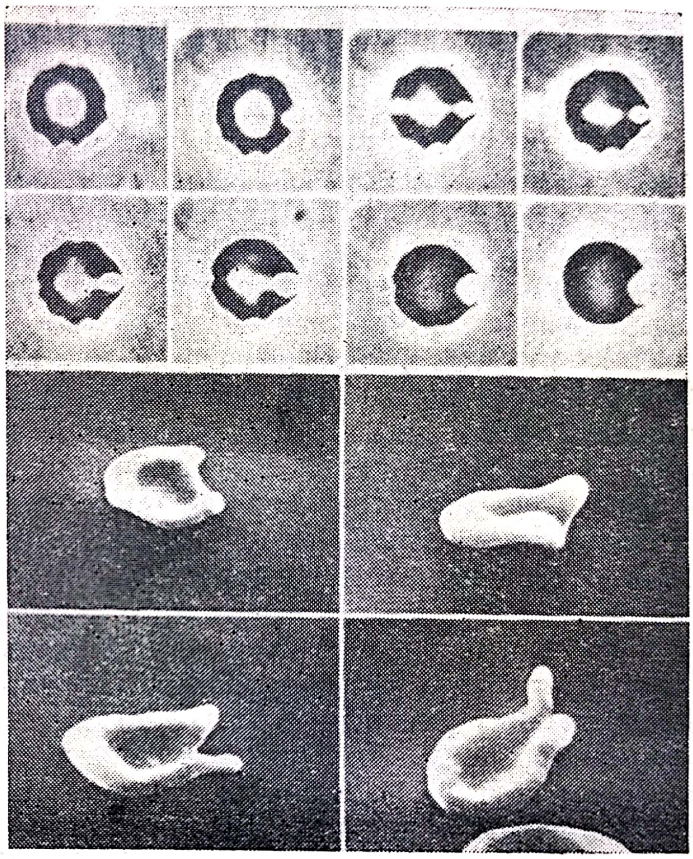


Fig. 7-3. Formarea experimentală a unui keratocit cu ajutorul unui fascicul de raze ultraviolete (după M. Bessis, 1971).
A: spotul de raze ultraviolete traversează eritrocitul de la dreapta la stînga; pe ultimele imagini se vede efectul lezional prin depărtarea a două puncte de pe membrana eritrocitară, fără să se producă însă hemoliza (proces urmărit prin microcinematografie). *B:* imagini ale aceluiași tip de hemoliză văzute la stereoscan.

3. ERITROFAGOCITOZA

Eritrocitele uzate fiziologic, sau lezate patologic, sînt fagocitate, predominant în zonele de stază de la nivelul anumitor organe;

a) *Fazele eritrofagocitozei.* Procesul de fagocitoză se desfășoară în 3 etape succesive: faza de aderență, de înglobare și de digestie (24, 25, 96, 235, 294).

1) *Faza de aderență* (sau de acolare). Celula lezată, depistată de celula fagocitantă, ajunge în contact cu aceasta într-o zonă în care se produc, instantaneu, modificări structurale complexe, ireversibile. În fig. 7—4 sus, se vede că aderarea eritrocitului la fagocit este atît de puternică încît, dacă este tras cu o pensă, eritrocitul se alungește depășind de mai multe ori diametrul său normal, fără să se detașeze. În imaginea de jos este redată o secțiune electronomicroscopică unde se observă că zona de aderare constă din mai multe suprafețe sinuoase.

2) *Faza de înglobare* (sau de ingestie) apare întrucîtva diferit, în funcție de tehnica de vizualizare folosită. La microscopul cu contrast de

Scanned with OKEN Scanner

fază se observă că fagocitul trimite două pseudopode care încercuiesc progresiv eritrocitul sau îl fragmentează în două părți mai mult sau mai puțin egale; extremitățile acestor tentacule fuzionează, înglobînd celula. La stereoscan, unde acest fenomen se vede spațial, se observă că fagocitul se excavează sub formă de pîlnie sau minge înțepată, cuprinzînd eritrocitul din toate direcțiile; acesta se alungește, capătă o formă de pară și în cele din urmă este înglobat în întregime (fig. 7-5). Întregul proces durează circa 5 minute. Uneori fagocitul nu reușește să cuprindă întreaga celulă; marginea „pîlniei", care strangulează eritrocitul alungit, se strînge tot mai mult, ca un sfincter, sfîrșind prin a-l secționa, fiind astfel încorporată numai o parte din celulă (fig. 7-6). Fragmentul neîncorporat poate să reintre pentru o perioadă scurtă (circa o oră), în circulația sanguină, apărînd pe frotiu sub formă de schizocit sau schizosferocit; tactismul de fagocitare a acestor fragmente este deosebit de pronunțat. Alteori se poate observa că, după secționarea eritrocitului, același fagocit continuă urmărirea fragmentului secționat printr-un alt pseudopod, înglobîndu-l într-o a doua etapă. Uneori pseudopodele trimise în urmărirea eritrocitului lezat sînt foarte lungi; ele urmează o cale sinuoasă, imprimată de torentul circulator. Aceste prelungiri reușesc adeseori să readucă eritrocitul vizat, pe cînd alteori ele se desprind de citoplasmă (fig. 7-7). În afară de microcinematografiere, imagini deosebit de plastice pe această temă au fost obținute prin tehnica fotografierii tridimensionale la stereoscan (fig. 7-8).

3) *Faza de digestie* se produce în mai multe etape; la început eritrocitul, învelit într-un fragment din membrana fagocitului, este înglobat în întregime, rămînînd închis în vacuola formată în jurul lui, numită *fagozom*. Spre aceasta se îndreaptă lizozomii, bogați în hidrolaze acide, care se contopesc cu fagozomul formînd *vacuola digestivă* sau *fagolizomul* (vezi fig. 1-11). S-a observat cum lizozomii varsă conținutul lor în fagozomi, cele două formații contopindu-și totodată membranele. Enzimele hidrolitice sînt active numai în interiorul acestei vacuole de digestie în care se constată resturile eritrocitului fagocitat. Digestia durează circa 3—10 minute (fig. 7-9, fig. 7-10 și fig. 7-11).

Cea mai mare parte a materialului digerabil, înglobat de macrofage, este descompus în fragmente cu greutate moleculară mică. Cu ajutorul microscopului electronic s-au putut urmări stadiile de început ale acestei digestii (granule de feritină, fragmente de stromă etc.). Fierul hemoglobinic se detașează rapid, fiind stocat sub formă de feritină.

b) *Selectarea și sediul eritrocitelor pentru hemoliză.*

1) *Modul de recunoaștere a eritrocitelor alterate (fiziologic sau patologic).* Bessis și colab. (1970, 1973) au descris fenomenul de fagocitoză prin intermediul mai multor tehnici, surprinzînd eritrocite în contact cu celule fagocitante după ce primelor li s-au provocat alterări de grade variabile. Ele au fost urmărite, comparativ, prin microcinematografie între lamă și lamelă la microscopul cu interferență și cu contrast de fază. Anumite faze au fost cercetate la microscopul electronic permițînd observarea unor detalii în diferite etape de înglobare și digestie, precum

Scanned with OKEN Scanner

și la stereoscan unde, aceste imagini, au putut fi văzute tridimensional (25, 26).

Indiferent de locul unde se produce hemoliza eritrocitelor îmbătrînite sau alterate se presupune o recunoaștere a lor de către celulele fagocitante printr-un *tactism* încă incomplet elucidat. Se pare că nu ar fi diferențe esențiale de tactism între eritrocitele îmbătrînite și cele patologice, între ele existînd totuși o anumită asemănare bazată pe rezistența lor scăzută. Bessis, prin distrugerea *in vitro* a unui eritrocit printr-un microfascicul de raze, a observat că acesta este înconjurat curînd de leucocite, care îl fagocitează (26). Tactismul fagocitelor se manifestă cu intensitate maximă față de eritrocitele recent lezate și care prezintă încă semne de activitate vitală; pentru a le acapara, fagocitele se îndreaptă asupra lor din toate direcțiile chiar împotriva curentului sanguin). Celula lipsită de viață (de exemplu prin mumificare și mai puțin prin spargere), nu prezintă „interes" pentru fagocit. Aceasta este fagocitată numai dacă apare în calea fagocitului; eritrocitul complet lipsit de activitate metabolică încetează să exercite un chimiotactism activ, în timp ce prin intermediul „exsudatului" pe care îl emite celula „în agonie", aceasta este recunoscută de fagocite care trimit spre ea pseudopode. Migrarea direcționată a macrofagelor ar putea fi declanșată prin chemotoxine de tip „agonic". Exsudatul ar putea fi înțeles și în sensul unor alterări metabolice, diferite de cele ale eritrocitelor tinere: leziuni ale membranei (prin anticorpi, opsonine etc.), modificări de catabolism intraeritrocitar etc., care le-ar face mai vulnerabile, expunîndu-le la acțiunea fagocitantă a celulelor macrofage.

În cazul hemolizei prin factori imuni fixarea anticorpilor are loc indiferent de vîrsta eritrocitelor, iar celulele care au fixat o cantitate mai mare de anticorpi (depășind un anumit prag) sînt selecționate primele pentru fagocitoză. Nu există diferențe esențiale între eritrofagocitoză și fagocitarea unui alt tip de celulă (sau a unui microb), ci doar deosebiri de detalii; exemplele date se referă însă la eritrofagocitoză.

2) *Celule cu capacitate fagocitară.* Un antigen pătruns într-un organism nu este lăsat să „vagabondeze" mult timp liber; prin reacții nespecifice împotriva lui (tactism), el atrage „patrulele" de micro- și macrofage, care îl captează. Ultimele îndeplinesc și funcția de agenți de identificare, transmițînd celulelor limfoide informația de specificitate a antigenului.

Fagocitoza este efectuată de celule circulante sau tisulare; dintre celulele sanguine, unele posedă o aviditate fagocitară mai mare (polinuclearele neutrofile și monocitele), altele arată un interes ceva mai mic față de antigenele celulare (polinuclearele eozinofile), iar altele nu acționează prin acest mecanism (limfocitele). Histiocitele (macrofagele tisulare) au o putere fagocitantă considerabilă, ele putînd fagocita în 10 minute pînă la 15 eritrocite. „Armata mobilă" a celulelor fagocitante (polinuclearele) a fost numită, impropriu, cu termenul de celule microfage, (din cauza taliei lor relativ reduse, deși sînt capabile să fagociteze celule întregi), pe cînd celulele fagocitante din măduva osoasă sau din alte

Scanned with OKEN Scanner

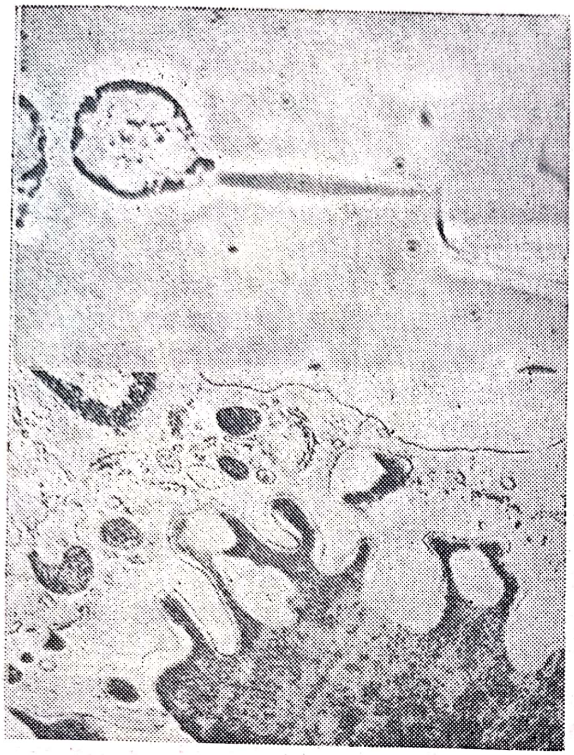


Fig. 7-4. Evidenţierea aderenţei eritrocitului fagocitat (după M. Bessis şi A. de Boisfleury, 1970).

Sus: acul micromanipulatorului (la dreapta) trage de eritrocitul care este pe cale de a fi fagocitat; „pîlnia" de ingestie exercită o puternică aderenţă de membrana celulei fagocitante (microscopie în contrast de fază). *Jos:* secţiune în zona de aderenţă a unui eritrocit pe cale de a fi fagocitat; la dreapta şi jos eritrocitul apare în culoare închisă, iar la stînga şi sus se vede citoplasma histiocitului fagocitant (Microscopie electronică, mărire ×15 000.)

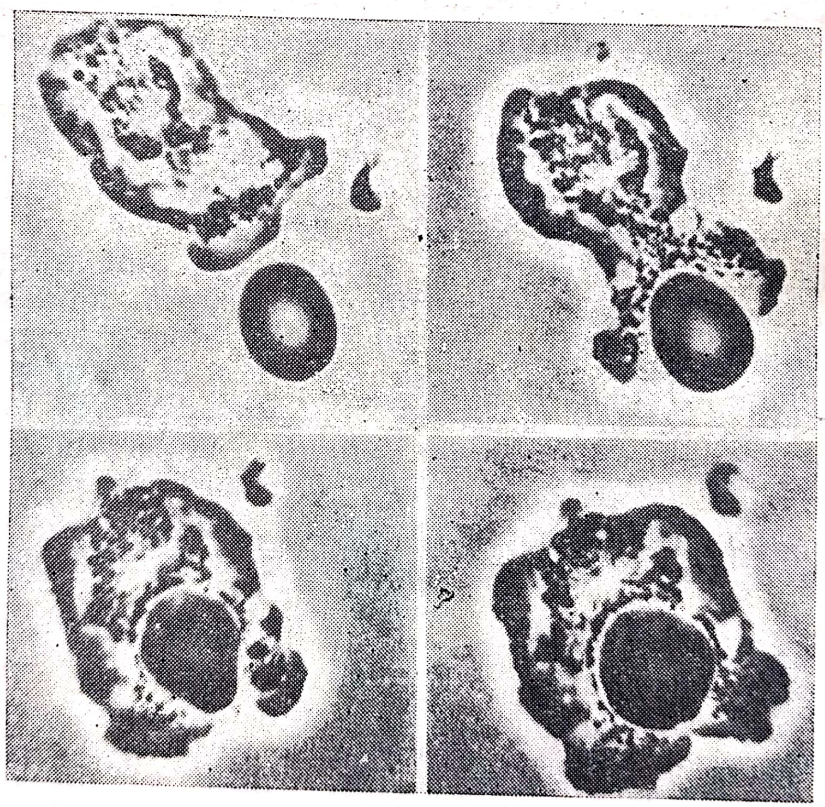
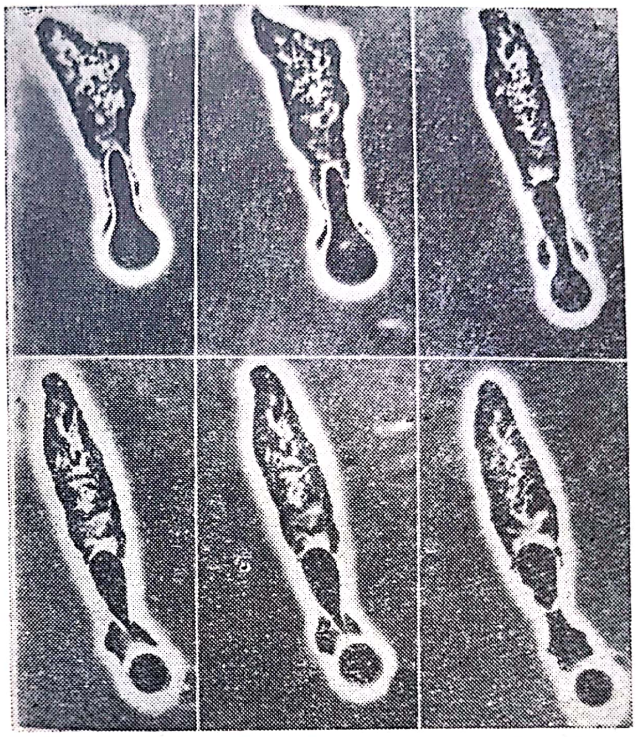


Fig. 7-5. Etape diferite de fagocitare (după M. Bessis şi A. de Boisfleury, 1970). *Sus:* formarea gurii de pîlnie (marginea ei este slab vizibilă din cauza refringenţei mari a eritrocitului); *mijloc:* deformarea eritrocitului sub formă de pară (de notat apariţia apendicelui caudal); *jos:* închiderea gurii pîlniei. Pe aceste imagini se observă bine lobii nucleari, granulaţiile neutrofile şi centrosomul; stereoscanul nu ar putea oferi aici decît indicaţii în legătură cu suprafaţa celulei (microcinematografiere la microscopul cu contrast de fază; imagini luate la interval de aproximativ 1 minut).

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 7-6. Secţionarea unui eritrocit în cursul fagocitării (după M. Bessis, 1966).

Microscopie cu contrast de fază a unui eritrocit sensibilizat printr-un antiser pus în contact cu un leucocit uman (mărire de 2 000×).



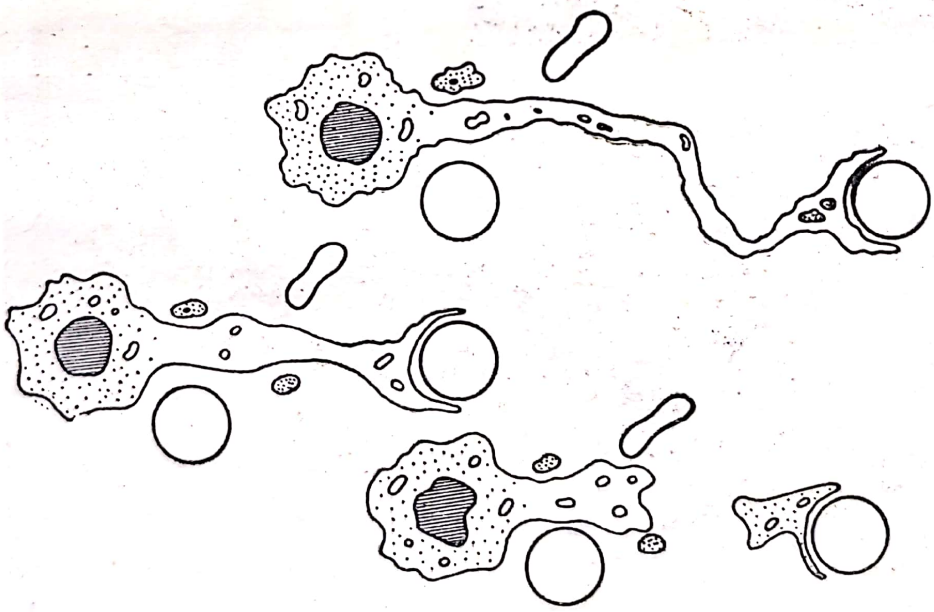


Fig. 7-7. Mobilitatea unui macrofag care trimite tentacule în direcţia unui eritrocit uzat, vehiculat de curentul circulator.

Sus: Pseudopode trimise de macrofag în urmărirea eritrocitului; acestea urmează traseul sinuos, imprimat de curentul circulator, reuşind să întoarcă eritrocitul îndepărtat. *Jos:* Desprinderea din macrofag a unui fragment de citoplasmă aderent de eritrocit; acest complex urmează să fie fagocitat de către alt macrofag. În jurul macrofagului se găsesc trombocite şi eritrocite normale care nu exercită nici un fel de tactism asupra macrofagului (desen realizat după vizionarea filmului lui Bessis şi col., subvenţionat de laboratorul Sandoz).

Scanned with OKEN Scanner

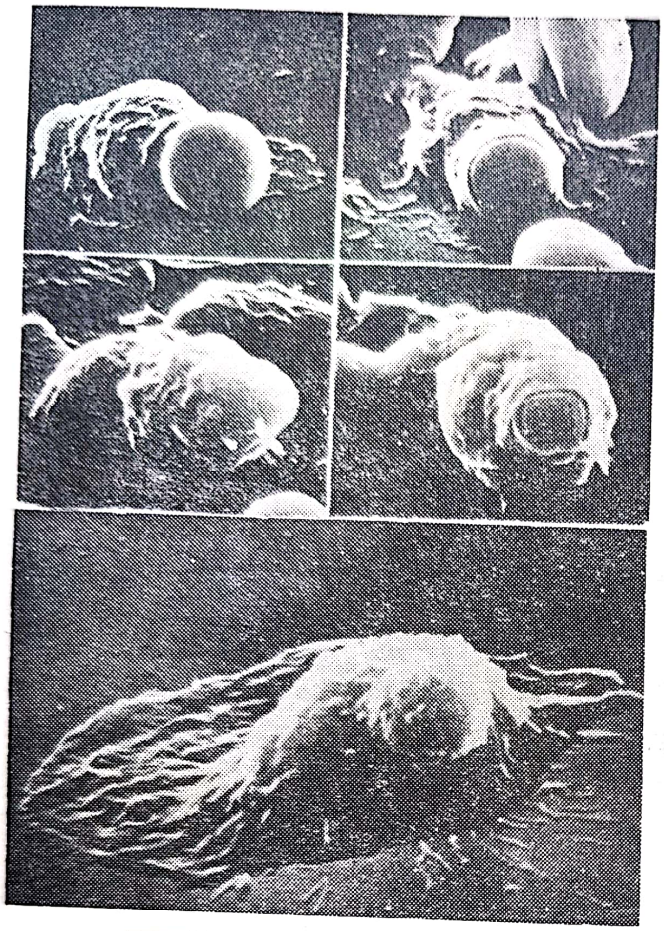


Fig. 7-8. Diferite etape ale închiderii gurii de fagocitare (după M. Bessis şi A. de Boisfleury, 1970).

Sus: fagocitul se apropie de sferocit, apoi îl acoperă treptat cu voalul hialinoplasmic pînă la învelirea lui în întregime; (cele două figuri de jos reprezintă aceeaşi imagine văzută din unghiuri diferite). *Jos:* închiderea gurii de fagocitare; fagocitul este întins pe lama de sticlă. În partea în care are loc fagocitoza, voalul citoplasmatic este retractat, în jurul acestei zone este concentrată activitatea litică a citoplasmei („siestă macrofagică") (microscopie la stereoscan).

Fig. 7-9. Fagocitarea unui eritrocit de către o celulă macrofagă (după M. Bessis, 1966).

Se observă bine vacuole de digestie. Pseudopodele aceleiaşi celule fagocitante caută să înglobeze stroma unui eritrocit care se găseşte în dreapta sus (microscopie electronică, mărire de 20 000×).

Scanned with OKEN Scanner

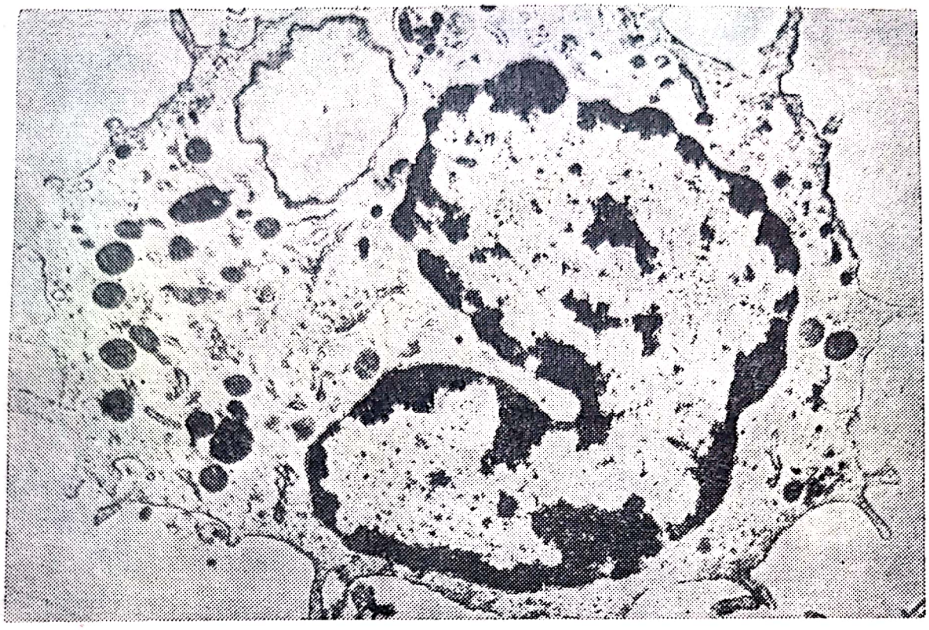


Fig. 7-10. Ultima etapă de digestie a unui eritrocit într-o celulă macrofagă (după M. Bessis, 1960).

Formația policiclică de sus-mijloc reprezintă un eritrocit pe cale de dispariție. Formația rotundă deasupra și în dreapta ei reprezintă un rest condensat de eritrocite cu conținut bogat în hemosiderină (microscopie electronică, mărire de 30 000×).

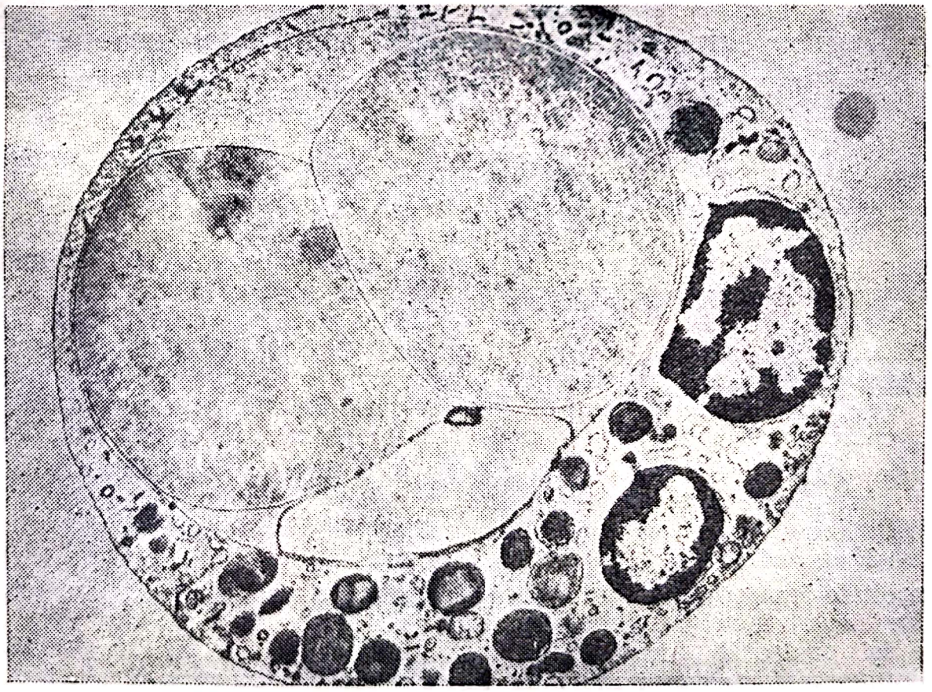


Fig. 7-11. Fagocitarea de către un eozinofil a 3 eritrocite (după M. Bessis, 1966).

Se recunosc, în dreapta-jos, cei doi lobi nucleari ai eozinofilului în secțiune și granulațiile caracteristice cu cristale în interior. Eritrocitul fagocitat din mijloc-jos se află într-un grad mai avansat de digestie decît celelalte două deasupra lui (microscopie electronică; mărire 20 000×).

Scanned with OKEN Scanner

organe (splină, ganglioni limfatici, ficat, alveole pulmonare etc.) au fost numite macrofage din cauza volumului lor mare și a aspectului heterogen al citoplasmei. Activitate macrofagică pot să dobîndească numeroase celule ale „SRH", acest termen nefiind specific pentru o anumită linie celulară. Aceste celule mononucleate (histiocite, celule Kupffer, diferite celule tisulare libere, monocitele circulante*) sînt capabile să capteze molecule, particule, celule etc., care posedă putere antigenică.

Cu tot polimorfismul lor accentuat, pînă în prezent nu pot fi făcute distincții funcționale între macrofage. Nu sînt complet elucidate nici mecanismele care duc la stimularea lor; este cert însă că ele au un rol inductor de bază a răspunsului imun, deși iradierea totală a organismului suprimă celulele limfoide și hematopoietice fără să afecteze macrofagele.

În anumite stări patologice, fagocitele „își depășesc atribuțiile" printr-un exces de activitate față de eritrocitele care ar mai putea transporta oxigenul încă un anumit timp în condiții satisfăcătoare (99).

3) *Locul de producere a hemolizei.* Fagocitarea eritrocitelor se produce în orice regiune a corpului, atît intravascular cît și extravascular. Un exemplu de fagocitoză extravasculară îl oferă cazul echimozelor, cînd eritrocitele extravazale sînt fagocitate în țesuturi.

Numeroase lucrări atestă că la om organele care au capacitatea cea mai mare de fagocitare sînt măduva hematoformatoare și, în al doilea rînd, ficatul, splina și alte organe. Astfel, Milschner (în 1956 și 1957) a fost primul autor care a cercetat în acest sens organ cu organ, urmărind repartiția radioactivității după administrare de eritrocite marcate cu izotopi și a constatat că măduva reprezintă organul cu cea mai mare putere de eritroclazie; splina ar juca un rol mai puțin important decît ficatul, ea acționînd mai mult în cazurile de hemoliză moderat crescută.

Chimiotactismul (sau eventual necrotactismul) declanșat de o celulă în agonie stimulează fagocitele care se îndreaptă în direcția ei, evocînd imaginea unei „haite" care se îndreaptă în direcția unei prăzi rănite, pe care o devorează fără să țină seama unii de alții. Au fost surprinse imagini în care un eritrocit uzat a fost revendicat concomitent de două fagocite, unul care a început să-l înglobeze parțial, iar altul care, concomitent, trimite pseudopode în direcția eritrocitului încă neînglobat, pentru a rupe din el cel puțin un fragment de celulă (fig. 7-12).

În alte cazuri, eritrofagocitoza poate fi multiplă, realizîndu-se o polieritrofagocitoză cu înglobarea concomitentă a 4—5 eritrocite din diferite direcții (fig. 7-13). Puterea fagocitară a unui macrofag este considerabilă, el putînd îngloba, pînă la 20—30 de eritrocite.

Eritrocitele susceptibile de a fi fagocitate devin, cel mai frecvent, sferocite În anumite cazuri însă (de exemplu cînd sînt fixate în prealabil prin glutaraldehidă), ele își păstrează forma discoidală chiar după ce sînt înglobate în întregime, hialoplasma fagocitului mulîndu-se pe suprafața biconcavă a eritrocitului fără să ia aspectul caracteristic de pîlnie.

---

* Monocitele sanguine (macrofagele circulante) au o origină medulară, de unde pătrund în sînge și în circulația limfatică avînd capacitatea de a se înmulți *in situ*.

Scanned with OKEN Scanner

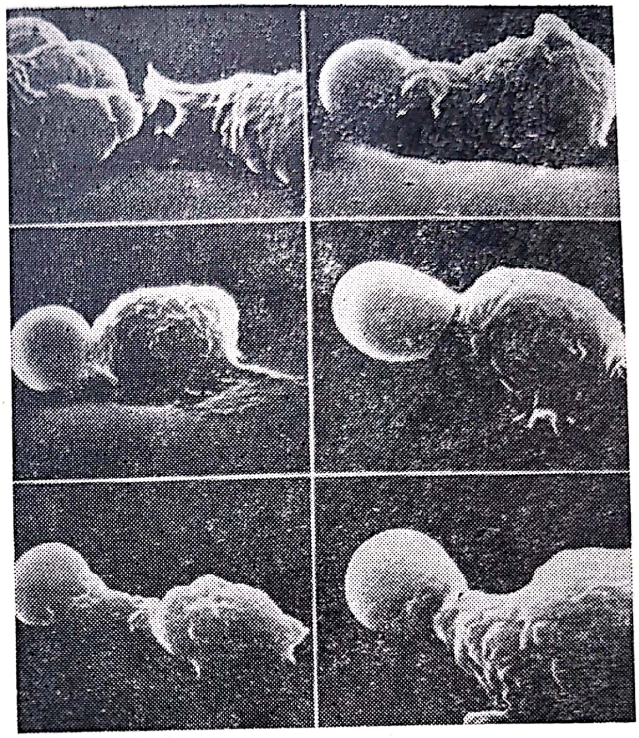


Fig. 7-12. Proces de fagocitoză a două celule macrofage asupra unui grup de sferocite (după M. Bessis, şi A. de Boisfleury, 1970).

Stînga-sus: aspect tridimensional al unui voal hialoplasmic emis de fagocitul din dreapta care se apropie de un grup de eritrocite pe jumătate ingerate de către un alt fagocit. Celelalte imagini arată diferitele etape ale formării gurii de pîlnie în jurul unui eritrocit (sferocit) (imagini la stereoscan).

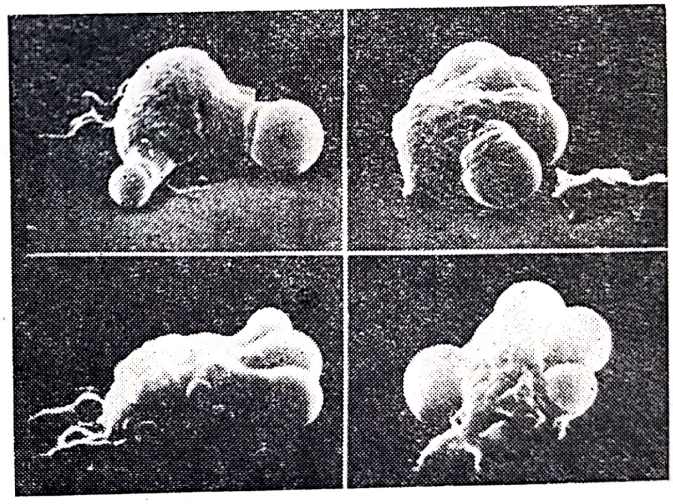


Fig. 7-13. Policitofagocitoză (după M. Bessis şi A. De Boisfleury, 1970).

Un fagocit emite voaluri în mai multe direcţii, putînd fagocita, concomitent, mai multe celule (imagine la stereoscan).

Eritrocitele normale, îmbătrînite în mod fiziologic, sînt hemolizate prin fagocitoză; în cazuri de procese hemolitice grave, însă, cînd conţinutul eritrocitar se evacuează şi în afara procesului de fagocitoză, fagocitele înglobează doar stroma fără hemoglobină; în astfel de cazuri, chiar simpla aderare a eritrocitului hiperfragil poate provoca hemoliza.

4. ALTERĂRI ERITROCITARE PATOLOGICE

Factorii şi cauzele care duc la hemoliza precoce sînt multipli; ei pot fi de natură eritrocitară (eritrocite „bolnave" sau cu potenţial morbid) şi extraeritrocitară (eritrocite sănătoase dar „rănite" de către factori externi diverşi. Cauzele intraeritrocitare sînt predominant ereditare, ex-

Scanned with OKEN Scanner

cepţie hemoglobinuria paroxistică nocturnă (HPN) sau boala Marchiafava-Micheli care este, cel puţin parţial, o boală dobîndită, pe cînd cele extraeritrocitare sînt aproape exclusiv cîştigate (fig. 7-14).

a. **Factori de natură intraeritrocitară.** Anomaliile de natură corpusculară care duc la scurtarea duratei de viaţă a eritrocitelor sînt:

Alterări ale structurii membranei eritrocitare (ex. sferocitoza ereditară, eliptocitoza ereditară, acantocitoza ereditară) (vezi pag. 196).

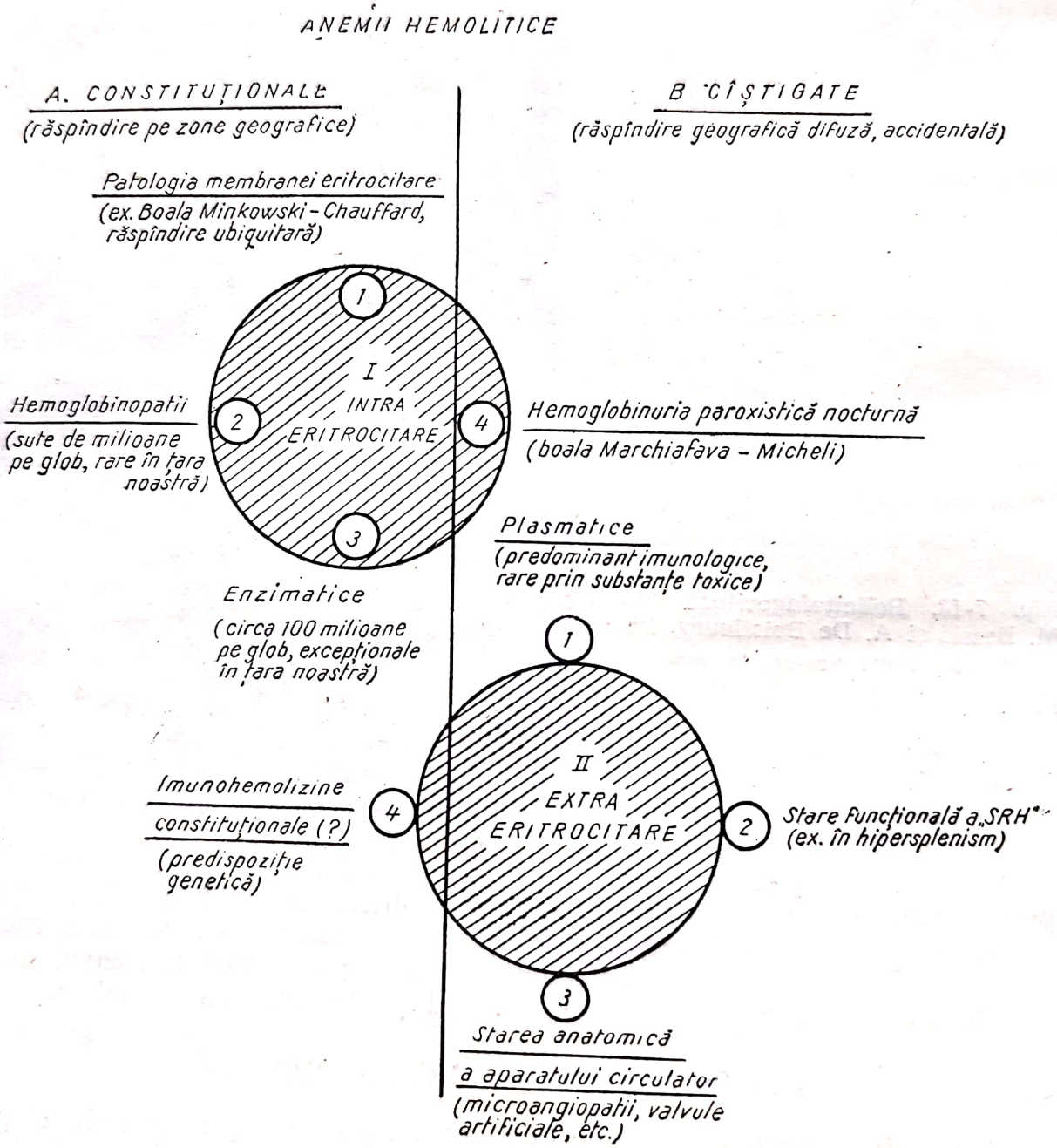


Fig. 7-14. Clasificarea anemiilor hemolitice, clasificare fiziopatologică atît după criterii genetice (ereditare sau cîştigate), cît şi după locul de acţiune a procesului hemolizant (localizat în eritrocit sau în afara lui).

Tulburări enzimatice intraeritrocitare interesînd, fie glicoliza (ex. deficitul de piruvat-chinază), fie oferta de hidrogen pentru menţinerea Hb în stare funcţională (ex. deficitul de G-6-PD) etc. (vezi pag. 263).

Hemoglobinoze (vezi pag. 295).

b. **Factori de natură extraeritrocitară;** aceştia pot fi extrem de diferiţi, mecanismele care produc distrucţia eritrocitară nefiind nici ele unitare:

Alterarea vaselor (mari şi mici) prin care sînt propulsate eritrocitele în cursul transportului lor de oxigen („căi de circulaţie defectuoase").

Alterarea mediului de suspensie a eritrocitelor.

— *substanţe industriale* şi *medicamentoase*, extrem de numeroase, cu acţiune fiziopatologică complexă;

— *toxice animale* (veninuri de reptile, înţepături de insecte);

— *infecţii*, de ex. septicemia cu bacili perfringens (clostridium welchii), apărută după manopere abortive, este cauza cea mai frecventă de anemie hemolitică, prin acţiunea lecitinazei asupra membranei eritrocitare;

— *agenţi fizici:* combustii întinse, perfuzii al căror solvent este apa distilată etc.;

— *paraziţi* (de ex. paludismul) care, deşi nu alterează mediul de suspensie al eritrocitelor, reprezintă un factor extraeritrocitar indus ca şi ceilalţi produşi;

— *complexele imune* sînt cele mai frecvente cauze de hemoliză extraeritrocitară.

Hemoliză prin alterarea anatomică a aparatului circulator. Starea anatomică a aparatului circulator poate fi cauza unor procese hemolitice importante. Contactul direct dintre eritrocite şi vasele sanguine alterate poate duce la fragmentarea eritrocitară. Eritrocitele presate de forţa de contracţie cardiacă sînt blocate de reţeaua de fibrină sau de suprafeţele rugoase ale arteriolelor, care realizează adevărate obstacole ce le blochează ca într-un năvod, iar presiunea exercitată asupra lor duce la diferite degradări morfologice (secţionări, încrestări etc.) (fig. 7-15). Eritrocitele în triunghi, în coif, eritrocitele ciupite, crenelate, în coajă de ou etc., sînt doar cîteva din numeroasele denumiri utilizate pentru a desemna alterările eritrocitare induse prin acest mecanism (vezi fig. 3-26).

Circumstanţele de apariţie ale anemiilor hemolitice prin alterarea căilor de circulaţie ale elementelor figurate sanguine, semnalate în numeroase procese morbide, au la bază, în afara factorilor mecanici, numeroase perturbări ale unor sisteme funcţionale (factori imuni, factori de coagulare etc.).

1) *Hemoliza prin factori care acţionează la nivelul vaselor mari şi a cordului.* În primii ani după aplicarea pe scară largă a chirurgiei cardiovasculare au fost observate şi cazuri de exacerbare a hemolizei; hemolizele intravasculare după astfel de intervenţii pot fi grupate astfel:

Scanned with OKEN Scanner

— *circulaţia extracorporeală*, prin devierea sîngelui normal prin căile artificiale rigide, poate duce la o liză mecanică; aici se poate încadra şi *rinichiul artificial*, în care este deviat sîngele pentru depurarea lui de produşii de catabolism;

— *protezele valvulare şi vasculare* reprezintă un grup important de cauze care provoacă fragmentarea eritrocitară;

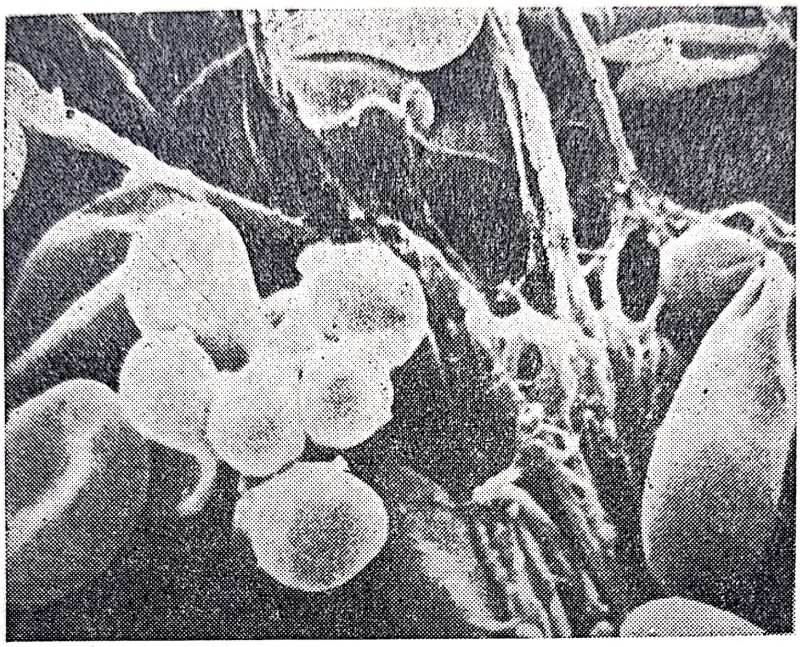


Fig. 7-15. Secţiune printr-un coagul sanguin (după B. S. Bull şi I. N. Kuhn, 1970).

La stînga jos un eritrocit normal; de remarcat strangularea eritrocitelor către reţeaua de fibrină care le poate secţiona datorită presării lor pe aceste reţele (microscopie electronică, mărire de 5 100×).

— *cardiopatiile valvulare*, în absenţa intervenţiilor pe cord, provoacă excepţional anemii hemolitice prin patogenie mecanică; ele au fost descrise totuşi în unele boli polivalvulare cu calcificări ale valvulelor.

În cazul implantărilor de proteze intracardiace mecanismul hemolizei constă în şocul hemodinamic pe care îl suferă eritrocitele la contactul cu valvula artificială sau cu vecinătatea acestora (247 *a*, 320). Distrucţia eritrocitară se realizează prin mai multe căi în care şocul asupra bilei şi vîrtejurile au rolul cel mai important. Acest şoc este mai mare la nivelul orificiului aortic, deoarece curentul sîngelui proiectat de ventriculul stîng în cursul sistolei are o viteză de ordinul 5 m/sec. Jetul loveşte din plin polul inferior al bilei şi barele lăcaşului în care se găseşte bila. Cu cît orificiul prin care sîngele proiectat este mai mic, la volum sistolic egal, cu atît viteza de şoc este mai importantă. Valvulele artificiale ale mitralei sau ale tricuspidei fiind largi, iar cavităţile umplîndu-se mai lent, contactul sîngelui cu bila este mai blînd, ceea ce face ca distrucţia să nu apară sau să fie de mică importanţă. Şoc puternic se creează şi în cazurile de implantare de valvule artificiale la nivelul orificiului pulmonarei. Vîrtejurile ce se produc în apropierea imediată a bilei creează zone de hipertensiune şi depresiune, care joacă de asemenea, rol important în distrucţia eritrocitară.

În prezent procesul de fabricaţie al valvulelor artificiale este mult perfecţionat, încît chirurgii pot să aleagă între mai multe caracteristici ale acestora. În general, ele constau dintr-o bilă îngrădită de bare metalice, care joacă rol de supapă (fig. 7-16).

Scanned with OKEN Scanner

2) *Hemoliză cu acţiune la nivelul vaselor de calibru mic.*

a) *Anemia hemolitică microangiopatică* (AHM) este un sindrom heterogen, în care elementul comun este alterarea vaselor mici (arteriole şi capilare), cu prezenţa pe frotiul sanguin a eritrocitelor fragmentate (76). Această manifestare poate apare în cadrul a numeroase boli cu etio-

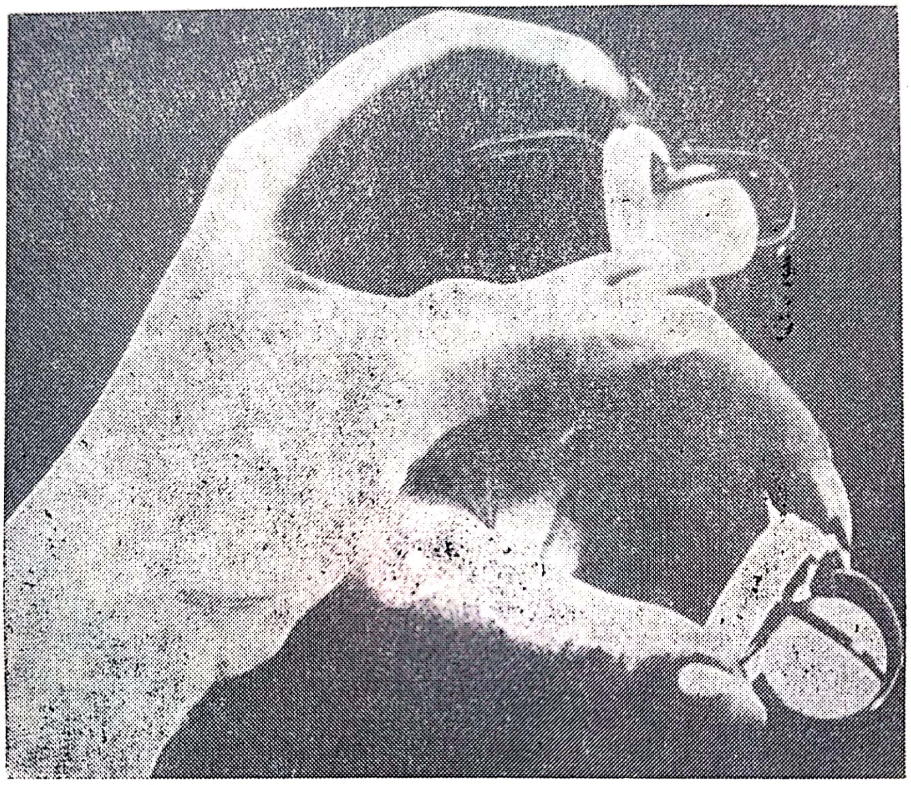


Fig. 7-16. Model de valvulă artificială (după A. Vanetti, 1972). Proteză Starr clasică cu bilă din material plastic (Silastic), închisă într-un „lăcaş" metalic format din trei arcuri.

logie şi patogenie diferită cu purpura trombocitopenică tromboembolică (sindromul Moschcowitz), sindromul hemolitic uremic, hipertensiunea arterială malignă (HAM), glomerulo-nefrita acută, eclampsia, colagenozele (lupus eritematos diseminat, periarterita nodoasă), cancerul diseminat (mai ales cancerele infiltrante ale stomacului, cancerul de pulmon, sîn), rejecţia transplantului renal, unele procese inflamatorii cronice (flebite, tuberculoza extrapulmonară). Cu toată această enumerare neobişnuit de lungă de maladii heterogene, lista nu se consideră încheiată. Fragmentarea eritrocitară este cauzată de anomaliile endoteliului vascular, mai ales a arteriolelor şi de prezenţa coagulării intravasculare diseminate (CID); la acestea se adaugă, după caracteristica procesului morbid, şi alte mecanisme ca leziunile de necroză fibrinoidă (cum este cazul în HAM), embolii tumorale în vasele mici (ca în metastazele canceroase), endotoxine (ca în unele procese infecţioase), complexe antigen-anticorp (ca în colagenoze) etc. (fig. 7-17).

Scanned with OKEN Scanner

b) *Alte hemolize prin agenţi fizici.* Anumiţi agenţi fizici pot să provoace liza eritrocitară prin mecanisme diverse; combustiile întinse duc la hemoliză prin alterarea directă a eritrocitelor prin supraîncălzire, dar şi prin mecanisme toxice; perfuziile, al căror solvent este apa distilată, duc la hemoliză osmotică etc. Mult discutată ca patogenie a fost hemoglobinemia de marş, al cărei mecanism s-a dovedit a fi tot mecanic.

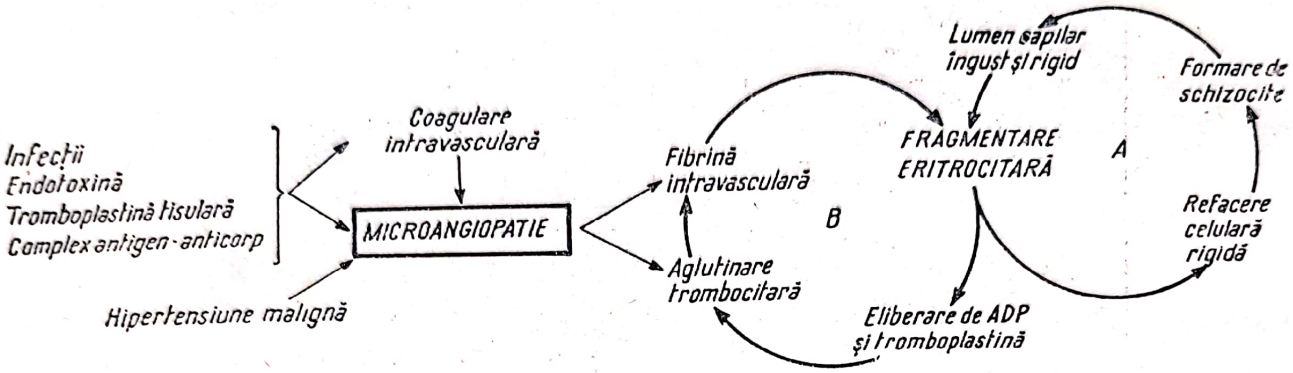


Fig. 7-17. Model de realizare a unei anemii hemolitice microangiopatice (după M. C. Brain, modificat de H. Levine, 1970).
Sînt înfăţişate două cercuri „vicioase": unul indus prin intermediul unor factori mecanici (A), iar altul prin intermediul unor factori chimici (B). Cele două cercuri se interferează, unul din mecanisme potenţînd pe celălalt.

Hemoglobinemia de marş este dată de ruperea traumatică a membranei eritrocitare, prezenţa Hb libere în ser şi eliminarea ei prin urină. Acest tip de hemoliză, descris de Fleischer în 1881 la un soldat, a mai fost observată în numeroase cazuri în care o parte a corpului a venit în contact persistent sau violent cu o suprafaţă dură (alergători de fond, caratişti* etc.), fără ca hemoliza să se constate cînd aceşti indivizi practicau alte sporturi cu solicitare fizică cel puţin egală (înot, ciclism etc.). Prima urină emisă de aceşti indivizi apare închisă la culoare, ea revenind la normal în următoarele 6—12 ore. Clinic poate fi confundată cu mioglobinuria care apare, de asemenea, după eforturi, dar care este însoţită de dureri musculare, diferenţierea făcîndu-se prin examenul spectroscopic al urinei.

Hemoliză prin alterarea mediului de suspensie al eritrocitelor

1) *Hemoliza prin complexe imune* (vezi pag. 392).

La producerea hemolizei *in vivo* concură, de regulă, mai multe mecanisme patogenice *(hemoliză prin factori micşti);* chiar şi în cazurile în care poate fi constatată prezenţa mai multor modalităţi de hemoliză, în general predomină unul sau cel mult două mecanisme.

2) *Hemoliza indusă prin medicamente şi produşi chimici* poate avea mai multe mecanisme patogenice, atît imunologice sau imunoalergice (cel mai frecvent) cît şi neimunologice.

a) *Hemoliza imunologică indusă prin droguri* poate fi produsă prin trei mecanisme distincte:

— *Adsorbţia unui drog pe suprafaţa eritrocitului — cu rol de haptenă* prin combinarea lui cu unele componente proteice ale membranei — sau fixarea drogului pe o macromoleculă plasmatică, acest complex fi-

* *Karate* = un sistem japonez cu autoapărare, fără armă, folosind lovirea cu muchia palmei.

xîndu-se apoi pe eritrocit. În primul caz membrana eritrocitară participă direct la alcătuirea substratului antigenic, pe cînd în al doilea, eritrocitul este un suport pasiv al reacţiei antigen-anticorp, în ambele intervenind şi fixarea complementului. Un exemplu al acestui tip de hemoliză este anemia indusă prin sensibilizarea eritrocitelor la penicilină.

— *Formarea de complexe imune prin alterarea membranei eritrocitare de către drog* sau toxină, acestea devenind antigene doar după acest contact, (de exemplu, hemoliza apărută după administrarea chininei, a chinidinei sau a stibofenului, în afara cazurilor de deficit enzimatic eritrocitar).

— *Formarea de autoanticorpi printr-un mecanism de autosensibilizare*, încă incomplet elucidat, indus prin creşterea sensibilităţii organismului faţă de antigenele proprii. Acest tip de hemoliză, observat după administrarea de medicamente hipotensoare ca (α-metildopa sau antiparkinsoniene ca L-dopa), poate fi, în general, cupat prin suspendarea administrării medicamentului.

b) *Hemoliză prin acţiune litică directă a drogurilor* apare mult mai rar decît s-a crezut cu cîteva decenii în urmă, deşi nici astăzi mecanismul imunologic nu este posibil de evidenţiat prin testele de laborator de care dispunem, decît într-un număr limitat de cazuri.

În cazul unor boli intraeritrocitare, chiar nemanifeste pînă atunci, hemoliza care apare poate fi rezultatul interacţiunii dintre terenul morbid şi substanţa chimică cu efect oxidant, de exemplu în cazurile de deficit de G-6-PD, hemoglobine instabile etc. Aceleaşi droguri sau produşi „toxici" pot provoca hemoliză chiar şi la indivizi cu eritrocite normale, prin acelaşi mecanism ca la bolnavii cu deficite intraeritrocitare, cu condiţia să fie administrate în doze mult mai mari.

În afara acestui tip de anemie, un număr de substanţe sînt capabile să producă hemoliză prin acţiune directă asupra eritrocitelor; de exemplu, hidrogenul arseniat (AsH_3) interacţionează cu grupările sulfidice, plumbul interferează în sinteza porfirinelor, dar produce şi precipitarea unor complexe macromoleculare din eritrocit etc. Alte substanţe sînt mai mult methemoglobinizante decît hemolizante, de exemplu aminele aromatice din grupa anilinei (fenilhidrazina, benzidina etc.), nitrobenzenii, cloraţii de Na şi K etc.; în aceste cazuri se formează şi corpi Heinz şi ulterior apare şi hemoliza. Benzolul, plumbul etc., au şi o acţiune mielotoxică puternică.

3) *Hipersplenismul.* Amplasată atît în calea circulaţiei aortice, cît şi a celei portale, îndeplinind în viaţa intrauterină o funcţie hematopoietică completă, splina este un organ limfoid care posedă în plus şi un sistem de pulpă roşie (cu sinusuri sanguine); rolurile ei sînt multiple: hemodinamice, imunologice etc.

Hipersplenismul este un sindrom în care citopenia este asociată cu o splenomegalie precum şi cu blocarea *in situ* a elementelor figurate sanguine în măduvă. Hematologic hipersplenismul se traduce prin scăderea numerică a uneia sau mai multor serii sanguine (anemie, leucopenie,

Scanned with OKEN Scanner

trombocitopenie), concomitent cu hiperplazia în măduva hematogenă a precursorilor seriilor deficitare în sîngele periferic. Acest sindrom foarte controversat este menţinut — cu rezervele respective — în toate tratatele de hematologie întrucît splenectomia corectează, în anumite cazuri, citopenia. Între splenomegalie şi hipersplenism nu există însă obligator o legătură de proporţionalitate; totuşi o splină mare implică, în general, o retenţie eritrocitară mai prelungită şi consecutiv, condiţii favorabile pentru stimularea, atît a imunocitelor, cît şi a macrofagelor.

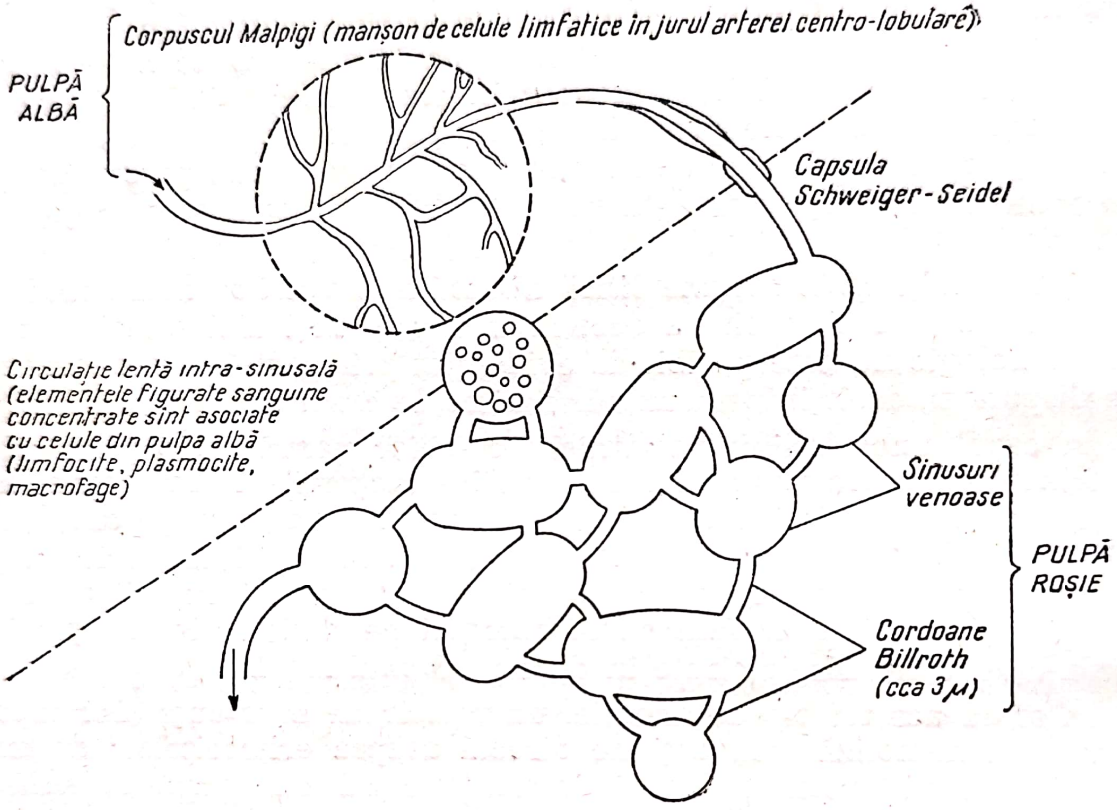


Fig. 7-18. Reprezentare schematică a structurii splenice.

Splina a fost considerată un „viscer fără parenchim". Histologic, acest sistem conţine două compartimente: pulpa albă (învelişul limfatic periarterial) şi pulpa roşie (un „fagure" de sinusuri sanguine cu un amestec dens de elemente figurate, printre care se găsesc numeroase macrofage). Eritrocitele trec prin acest organ, primul compartiment fiind furnizor de imunoglobuline, iar al doilea bogat, mai ales, în celule macrofage, fiind sechestrate şi lichidate elementele cu defecte morfologice sau cu modificări moleculare. Trecerea eritrocitelor prin „fenestraţiile" sinusale ale cordoanelor Billroth, cu dimensiune de circa 3 μ, le obligă la deformări la care rezistă doar cele elastice (discocitele), sferocitele rămînînd, adesea, blocate *in situ*. Fenestraţiile hepatice sau medulare au un diametru de circa 4 μ, ele putînd fi traversate de majoritatea eritrocitelor. Hemoconcentraţia accentuează hipoglicemia locală, scăzînd substratul glicolizei, proces care perturbă menţinerea în stare funcţională a pompei de sodiu, mai ales pentru sferocite.

La indivizii a căror splină a fost înlăturată operator pentru ruptură traumatică şi care — bineînţeles — au avut anterior un număr normal de reticulocite, siderocite etc. se constată, cu regularitate, o creştere importantă a acestora în sîngele circulant. De aceea s-a presupus existenţa în splină a unui mecanism care îndepărtează particulele din eritrocitele incluzionate printr-un mecanism de extragere, fără a leza aceste

Scanned with OKEN Scanner

celule. Unii autori deosebesc hipersplenismul, pe care îl consideră o exagerare a funcţiilor normale ale splinei mărite de volum, de *„dissplenism“* care ar fi o deviere patologică a unor funcţii splenice (144). Hipersplenismul şi displenismul includ mecanismele anemiante multiple:

— *hipersplenismul medulo-inhibitor*, în care splina ar acţiona la distanţă asupra măduvei pe care ar inhiba-o în activitatea eritropoietică prin intermediul unui factor umoral care nu a putut fi izolat pînă în prezent;

— *hipersplenismul imunologic:* prin pasajul prin pulpa albă, eritrocitele trec printr-o zonă în care iau naştere limfocite T şi B care efectuează o selecţie clonală a eritrocitelor cu antigenicitate „interzisă“ (fig. 7-18);

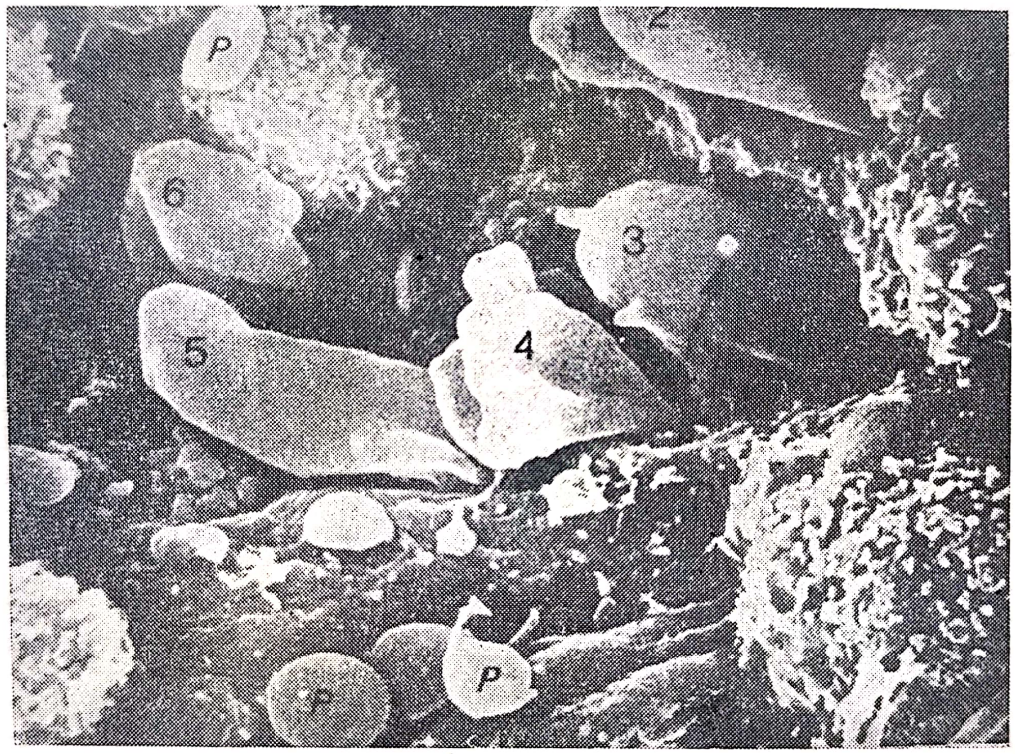


Fig. 7-19. Imagine la stereoscan a unui sinus splenic (după L. Weiss, 1974).

Este înfăţişată o „grotă“ sinusală cu pereţi neregulaţi în care se văd mai multe orificii ale cordoanelor Billroth prin care au intrat eritrocitele (notate de la 1 la 6), macrofagele, cu suprafaţă încreţită, precum, şi trombocitele, cu aspect sferoid (notate cu litera P). Eritrocitul nr. 3, cu aspect sferoid, prezintă pe suprafaţa lui mai multe excrescenţe (mărire ×5 000).

— *hipersplenismul fagocitar:* sîngele pătruns în spaţiile sinusale (bogate în macrofage şi imunocite) şi controlat, la intrare şi ieşire, de un sistem de sfinctere, este supus unei eritroconcentraţii; în cursul stagnării eritrocitelor sînt selectate cele care prezintă defecte structurale sau sînt uzate, putînd trece prin sfincterele eferente doar cele suple şi cu funcţie metabolică intactă; tot aici se produce şi selectarea imunologică (fig. 7-19).

Scanned with OKEN Scanner

B. NOŢIUNI DE IMUNOLOGIE

Imunologia este ştiinţa care se ocupă cu studiul apărării „informaţionale" a organismelor. Termenul de imunitate* reprezintă neutralizarea efectului nociv al unor substanţe străine, penetrate în organism, protejîndu-l contra dereglării homeostaziei (echilibrelor) celulare şi umorale ce ar putea să apară dacă acestea ar interfera cu sistemul propriu de funcţionare. Individualitatea unui organism (self) faţă de lumea înconjurătoare (non self), exprimată pe plan filozofic prin noţiunea de „eu" şi „restul universului", este asigurată prin sisteme complexe de apărare care concură la menţinerea identităţii structurale şi funcţionale în contra unor noxe externe; ele pot acţiona prin mai multe nivele de apărare:

— *apărarea mecanică* este un scut reprezentat, în principal, de piele şi mucoase, înzestrate cu diverse „capcane" anatomice (sistem ciliar etc.) şi cu elaborarea unor secreţii protectoare;

— *apărarea enzimatică* se realizează prin anihilarea factorilor nocivi din mediu prin factori lipsiţi de specificitate informaţională (suc gastric, pancreatic, fagocitoza polinuclearelor etc.);

— *apărarea imunologică* reprezintă sistemul de protecţie diferenţiat şi sensibil pentru păstrarea individualităţii structurale la nivel monomolecular împotriva acţiunilor perturbante ale unor elemente străine (153, 203, 252, 278).

Imunohepatologia a lărgit, în ultimele decenii, considerabil vechile cadre înguste ale imunologiei, concepută ca studiu al mecanismelor de apărare contra infecţiilor; ea ocupă astăzi un loc important în numeroase discipline biologice (serologia, genetica, clinica, medicina legală, antropologia etc.), iar hemalogia şi microbiologia constituie domeniile principale de studiere a imunologiei moderne.

1. COMPLEXELE IMUNE

În conflictul imun iau parte două sisteme cu acţiune contrară: antigenele şi anticorpii, ambele de natură macromoleculară, putîndu-se prezenta, fie libere, fie ataşate de un suport celular. Astfel, în sistemul imunităţii umorale, anticorpii (imunoglobulinele), produşi de imunocitele respective, circulă liberi în plasmă, pe cînd în sistemul imunităţii de tip celular, înseşi imunocitele (limfocite de tip T) sînt prezente la locul conflictului antigen-anticorp. În conflictul imun macrofagele au rol de mediatori, în sensul prelucrării antigenului şi a transferului către imunocite a unor mostre antigenice specifice. Acţiunea de anihilare a anticorpilor umorali este desăvîrşită de anumite sisteme enzimatice suplimentare (complement, properdină etc.).

a. **Antigenele** (vezi cap. 3, pag. 174).

b. **Anticorpii** sînt macroglobuline proteice care apar în diferite umori ale organismului, ca urmare a pătrunderii din exterior a unor antigene (58, 99).

---

* *Imunitas-tis* (cuv. lat.) = scutire de impozite, eliberare de unele obligaţii.

Scanned with OKEN Scanner

Termenul de anticorp a fost creat pentru a exprima existența unor produși cu rol în protejarea organismului contra agresiunii unor „corpi străini" (non *self*). În mod normal organismul nu elaborează anticorpi activi contra propriilor celule; ei pot apărea în anumite condiții patologice ca urmare a pierderii toleranței imune sau prin alte mecanisme.

1) *Clasificarea anticorpilor*

A) *După modul de formare a anticorpilor*

— *Anticorpii regulari* sau *constanți* sînt prezenți cu regularitate în serul indivizilor, cu condiția ca antigenul corespunzător să lipsească de pe eritrocite; de exemplu, în sistemul ABO toți indivizii ale căror eritrocite nu conțin antigenul A sau B au în ser anticorpi anti-A, respectiv anti-B. Ei se mai numesc și anticorpi naturali sau nestimulați deoarece apar în afara unui stimul antigenic corespunzător evident (171, 199, 331).

— *Anticorpii iregulari* nu există în mod normal la indivizii ce nu posedă antigenele corespunzătoare, prezența lor fiind consecutivă unei imunizări, de regulă, prin transfuzie sanguină sau prin sarcină, de exemplu izoimunizarea femeilor Rh negative printr-o sarcină cu făt Rh pozitiv.

B) *După capacitatea aglutinantă a anticorpilor*

— *Anticorpii compleți sau bivalenți* sînt capabili de a produce aglutinarea eritrocitelor puse în suspensie salină datorită existenței unor punți

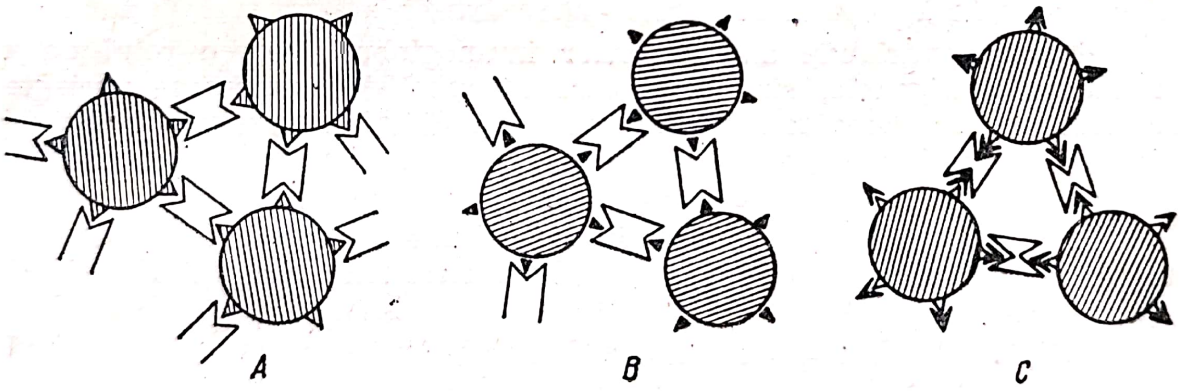


Fig. 7-20. Reprezentare schematică a diferitelor tipuri de antigene și anticorpi de pe suprafața eritrocitelor (după C. Nicol și M. Renoux, 1967).

A. Schema aglutinării, cînd antigenul aparține eritrocitului însuși. Eritrocitele au pe suprafața lor (ca și bacteriile), numeroase zone antigenice care provoacă aglutinarea în prezența anticorpilor specifici. B. Schema aglutinării cînd antigenul, străin de eritrocit, este fixat pe suprafața acestuia ca pe un suport; la anticorpii formați „cad victime" și eritrocitele cu care antigenele formează un corp comun. C. Schema aglutinării cînd anticorpul fixat pe eritrocit, deși este o globulină, este „incomplet", acesta comportîndu-se ca un antigen suplimentar, fiind necesară, pentru punerea în evidență, o antiglobulină specifică (reacție tip Coombs).

de legătură cu cel puțin două zone active de legare (Fig. 7-20 A și B). Aceștia sînt anticorpi naturali, dar există și anticorpi imuni de acest tip.

— *Anticorpii incompleți, blocanți sau univalenți* nu sînt capabili să producă aglutinarea eritrocitelor suspendate în soluție salină, dar învelesc suprafața eritrocitelor prin fixarea lor pe antigenele corespunzătoare. Prezența lor poate fi pusă în evidență prin intervenția unui al doilea

Scanned with OKEN Scanner

anticorp („anti-anticorp") cu specificitate antiglobulinică umană (vezi testul Coombs, pag. 431), prin care se obține aglutinarea acestor eritrocite, pe cînd eritrocitele normale, care nu au fixat astfel de anticorpi, rămîn insensibile la acțiunea anticorpilor antiglobulinici (fig. 7-20 C).

2) *Structura chimică a anticorpilor.* Anticorpii fac parte din categoria imuno-globulinelor. La migrarea electroforetică globulinele prezintă mai multe „vîrfuri" de separare relativ individualizate (α_1, α_2, β și γ). Imunoglobulinele migrează electroforetic în regiunea globulinică β-γ (vezi fig. 3-4). Metode imuno-electroforetice, completate cu ultracentrifugarea și cu alte tehnici, au permis individualizarea a 5 clase de imunoglobuline umane: IgG, IgA, IgM, IgD și IgE.

Structura de bază a imunoglobulinelor este rezultatul asamblării a 4 lanțuri polipeptidice, 2 grele sau H (de la cuv. engl. *heavy*) și 2 ușoare sau L (de la cuv. engl. *light*). Acestea sînt legate între ele prin cel puțin patru legături disulfidice (—S—S—). Legătura cuaternară poate fi desfăcută în lanțuri polipeptidice terțiare (2H și 2L), iar prin proteoliză enzimatică se pot obține fragmente polipeptidice și mai scurte (fig. 7-21).

Cele 5 tipuri de imunoglobuline își au fiecare cîte un tip de lanț greu, specific de clasă, notat cu simbolurile α, β, γ, δ și ε, pe cînd lanțurile ușoare sînt doar de 2 tipuri diferite, lanțul kappa ($\varkappa$) și lanțul lambda (λ); din combinarea lor rezultă 10 tipuri de combinații posibile. O moleculă de imunoglobulină conține totdeauna același tip de lanț ușor (2 $\varkappa$ sau 2 λ), neexistînd combinații mixte.

Regiunile variabile ale lanțurilor imunoglobulinice, cu rolul de a recunoaște antigenele, sînt zone care răspund de numeroase variante structurale, corespunzătoare cu marea variabilitate a structurilor antigenice, spre deosebire de regiunea constantă a lanțurilor, care este identică pentru anticorpii din clasa respectivă.

Caracteristica fundamentală a imunoglobulinelor este heterogenitatea; ea poate fi exprimată prin 3 nivele de diferențiere: izotipia, alotipia și idiotipia (99, 254).

Izotipia reprezintă specificitatea de specie, avînd o anumită structură comună pentru toți reprezentanții aceleiași specii; de exemplu IgG cuprinde 4 subtipuri de izotipie, fiecare putîndu-se combina atît cu lanțul kappa, cît și cu lanțul lambda de unde reies 8 subclase (IgG_1 $\varkappa$, IgG_1 λ, IgG_2 $\varkappa$, IgG_2 λ etc.).

Alotipia reprezintă specificitatea individuală a moleculei, comună pentru toate celulele aceluiași individ (cuv. gr. *allos*=altul și *typos*=caracter). Se cunosc 4 tipuri alotipice de imunoglobuline umane independente, în funcție de 4 sisteme alelice: *sistemul Gm*, propriu lanțurilor grele, cu peste 20 de factori specifici. *Sistemul Inv*, prezent pe lanțurile ușoare kappa, cu 3 subtipuri, *sistemul ISf* (imunoglobulină San Francisco) situat pe fragmentul Fc și *sistemul Am* situat pe IgA_2 cu 2 subtipuri.

Idiopatia reprezintă specificitatea proprie a unor produși moleculari (imunoglobuline), secretați de o anumită clonă celulară (populații de celule ce descind din diviziunea repetată a unei singure celule). Variațiile

Scanned with OKEN Scanner

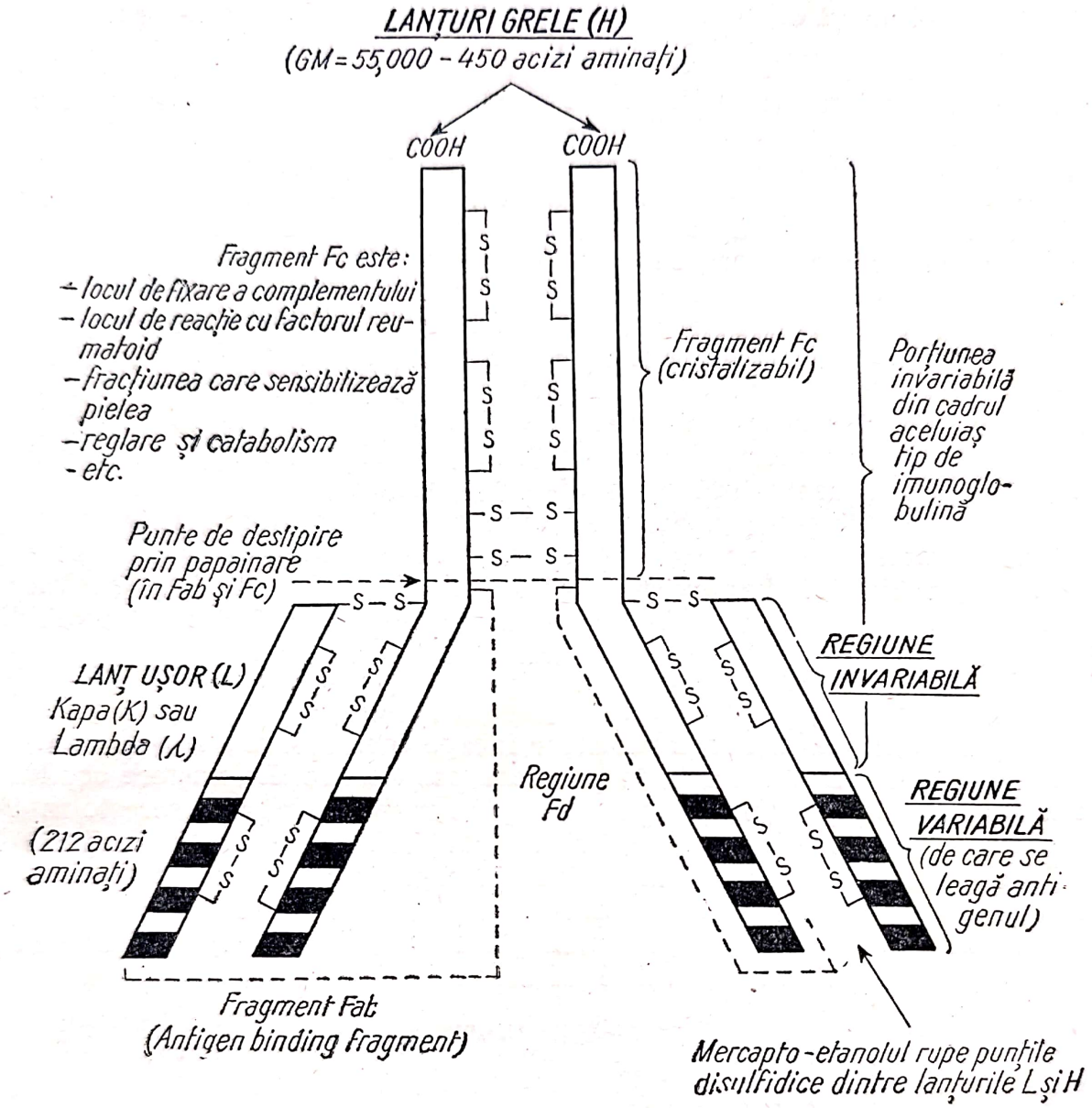


Fig. 7-21. Model de moleculă IgG intactă și după digestie proteolitică, în combinația L—H—H—L (modificat după M. W. Turner, 1972).

Greutatea moleculară (GM) a unei astfel de imunoglobuline G este de 150 000 și conține 1 320 de acizi aminați; lanțul greu (H) are o GM de circa 55 000 și conține circa 250 de acizi aminați, iar lanțul ușor (L) are o GM medie de circa 22 500 și conține circa 125 de acizi aminați. Fiecare lanț polipeptidic prezintă cîte o regiune constantă și cîte o regiune variabilă. Extremitatea N-terminală, care prezintă o structură inconstantă, este redată în dungi; ea descrie, spațial, o pliere specifică, astfel ca imunoglobulina să se poată fixa, ca un mulaj, pe o anumită zonă a antigenului, datorită valențelor sale combinative variabile. Digestia prin pepsină duce la separarea IgG în 3 fragmente de mărime apropiată: Fc (fragment cristalizabil) ce conține circa 1/2 din lanțurile grele (capătul C terminal) și în 2 fragmente Fab („antigen-binding fragment") reprezentat din jumătăți de lanțuri grele (capătul N terminal), plus lanțurile ușoare corespunzătoare. Partea de lanț greu, conținută în fragmentul Fab, este notată Fd. (Litera d a fost aleasă pe considerentul că în alfabet urmează literelor a, b, c, așezate în această ordine dintr-o pură întîmplare: Fab și Fc.)

Cele două fragmente principale au proprietăți biologice diferite; fragmentul Fab posedă specificitate de anticorp, pe cînd Fe are capacitatea de a fixa complementul etc.

Scanned with OKEN Scanner

de idiotipie conferă organismului capacitatea de a sintetiza anticorpi capabili de a se combina specific cu orice fel de antigen străin de organism.

În timp ce imunoglobulinele normale prezintă o populație moleculară heterogenă, imunoglobulinele patologice (mielom, boală Waldenström) se caracterizează prin omogenitate moleculară. Aceste „paraproteine" migrează electroforetic foarte strîns, dînd vîrfuri ascuțite. Denumirea de paraproteine nu exprimă de fapt prezența unei proteine anormale structural, ci doar o modificare cu caracter pur cantitativ, caracterizată prin prezența unei populații de proteine cu structura moleculară normală, însă invariabile, rezultată din proliferarea unei singure clone celulare (gamopatie monoclonală). Această perturbare ar fi consecința unei dereglări a proliferării unei clone de plasmocite sau de limfocite.

3) *Repartizarea imunoglobulinelor în organism.* Imunoglobulinele reprezintă circa 20% din totalul proteinelor plasmatice. Din acestea IgG reprezintă circa 75—80% ceea ce, în valoare absolută, revine la circa 1,2 g% ser. Serul sanguin nu este rezervorul principal al IgG din organism, cea mai mare parte găsindu-se în sectorul extravascular; în organismul întreg există 1—1,5 g de IgG/kilocorp. Din celelalte imunoglobuline IgA reprezintă circa 200 mg%, IgM circa 100 mg% pe cînd IgD și IgE se găsesc în cantități foarte mici; aceste diferențe mari cantitative se explică și prin durata de viață diferită a acestor proteine.

Sinteza fetală a imunoglobulinelor începe încă în luna a 7-a, dar un ritm important este atins abia în perioada post-natală. La naștere copilul posedă un stoc important de IgG de origină maternă, care descrește însă rapid și se compensează apoi prin sinteze de imunoglobuline proprii.

La adult, pătrunderea unui antigen în organism este urmată la scurt timp de elaborarea de imunoglobuline de tip M, iar după repetarea injecției cu antigen, își fac apariția imunoglobulinele de tip G; cînd acestea ating un nivel maxim, sinteza de IgM încetează.

c. **Factori nespecifici ai imunității umorale.** În afară de anticorpii cu înaltă specificitate, serul sanguin și alte umori ale organismului dispun de un număr important de substanțe proteice, în cea mai mare parte enzime, grupate în anumite sisteme active; obișnuit ele se găsesc sub formă inactivă, fiind activate în urma unor stimuli.

1) *Complementul* (C′) reprezintă un ansamblu de enzime, prezente în serul sanguin și în alte umori ale organismului care, în prezența complexelor antigen-anticorp, au o acțiune distructivă asupra membranelor celulelor (microbi, eritrocite etc.).

Termenul datează de la sfîrșitul secolului trecut și începutul secolului nostru (1899—1901) cînd s-a crezut de către Ehrlich, Bordet și alții că la baza „completării" acțiunii distructive a anticorpilor se adaugă o substanță „complementară". Deși se știe astăzi că complementul nu reprezintă o substanță unică, termenul se păstrează, prin tradiție, dar cu atașarea atributelor de „sistem" sau „componente" ale complementului (110, 203).

Scanned with OKEN Scanner

Sistemul complement cuprinde 11 proteine notate cu majuscula C, urmată de o cifră de la 1 la 9, întrucît C_1 este alcătuit din trei subunități notate C_1q, C_1r și C_1s. Reacțiile se succed în ordinea cifrelor, cu excepția C_4, care acționează între C_1 și C_2, numerotarea fiind stabilită înainte de a se fi cunoscut cu exactitate cronologia lor. Acești 11 factori ai sistemului complement sînt de natură globulinică, reprezentînd circa 10% din globulinele serice. Unii din ei au fost obținuți în stare de înaltă puritate; ei se deosebesc, prin structura primară, greutatea moleculară, constanta de sedimentare, mobilitatea electroforetică, concentrația în ser, labilitatea termică, conținutul glucidic etc.

Aceste componente se află în stare inactivă, la fel ca cei 13 factori ai coagulării și ai kininelor; activarea lor se face pe baza unor stimuli. După cum coagularea este declanșată de lezarea pereților vasculari (mecanism intrinsec) sau pe cale direct umorală (mecanism extrinsec), tot așa și sistemul complement poate fi activat, fie direct, de către complexele antigen-anticorp, fie indirect de către properdină sau de către alți agenți, punerea în mișcare a „cascadei" de reacții a sistemului complement nu au loc deci după vreun mecanism unic.

Cele 11 proteine ale sistemului complement pot fi grupate în trei unități funcționale: *unitatea de identificare și alarmă*, care cuprinde C_1q, r și s, *unitatea enzimatică*, care cuprinde C_4, C_2 și C_3 și *unitatea citolitică* care cuprinde componentele de la C_5 la C_9. În momentul în care antigenul a fost reperat de către anticorpul specific, imunoglobulina suferă o modificare de formă (alosterică), ceea ce permite primei proteine din sistemul complement (C_1q) să se combine cu zona Fc a imunoglobulinei („identificarea agresorului") și să determine declanșarea reacțiilor în etape pe întregul sistem. Din cele 5 imunoglobuline doar IgM și parțial IgA sînt capabile de a acționa cu complementul. Enzima C_1s activată atacă enzima C_4 deschizînd un alt grup de reacții care preced complexul celor care realizează „spărtura" propriu-zisă a membranelor. De altfel reacțiile C_1, C_4 și C_2 pot fi scurtcircuitate, în lipsa unei cantități minime de anticorpi, prin acționarea C_3 de către sistemul properdinic sau a altor factori nespecifici. Ultimul grup de enzime realizează întîi o „eroziune" la nivelul membranei pe care o adîncesc C_8 și C_9 realizînd orificii a căror bordură este alcătuită din proteine (vezi și fig. 3-16); perforarea stratului dublu lipidic nu ar permite menținerea îndelungată a orificiilor formate care să ducă la alterarea mediului interior al celulei. În urma acțiunii complementului asupra eritrocitelor se formează „leziuni" cu un diametru de circa 10 nm (199 a). Din punct de vedere al eficienței litice, anticorpii îndeplinesc doar funcția de identificare a agresorului și cel mult de îngrădire a activităților nocive, în timp ce complementul este „executorul" sentinței de anihilare.

Punerea în evidență a consumului de factori din sistemul complement se realizează prin tehnica de titrare a complementului (vezi fig. 7-43). Complementul crește odată cu vîrsta; patologic crește în procesele inflamatorii (reumatism inflamator, poliartrită reumatoidă etc.). Scăderea nivelului de complement este mai rar întîlnită, însă are un interes mai mare decît hipercomplementemia, astfel, el este scăzut în caz de deficit de sinteză (ciroză hepatică) sau consum exagerat (anemie hemolitică autoimună, hemoglobinurie paroxistică nocturnă, nefropatiile din lupusul eritematos diseminat etc.) (110).

Activarea complementului — în afară de latura pozitivă de distrugere a celulelor agresoare — poate avea și efecte nocive, autodistructive, pentru organism. Acesta dispune de mecanisme de control a activării complementului (inactivatori, factori litici etc.), care nu realizează însă totdeauna un control perfect, celulele gazdă însele putînd deveni victimele acestei arme atît de eficiente.

Scanned with OKEN Scanner

2) *Alţi factori de apărare umorală nespecifică:*

a) *Sistemul properdinic.* Complementul poate fi activat în primele sale stadii de organizare şi prin alte mecanisme decît anticorpii. În afara unor factori externi (microbi, levuri, venin de cobra etc.) organizarea primelor nuclee hemolitice ale complementului (formarea de C_1, C_4 şi C_2) poate fi iniţiată de către un sistem enzimatic numit properdinic care scurtcircuitează amorsarea indusă de anticorpi. Acest sistem, deşi nespecific, intervine în apărarea imunologică în fazele iniţiale, cînd anticorpii specifici, fixatori de complement, nu s-au format încă în cantitate suficientă (200 a).

b) *Lizozimul* (muramaza) este o enzimă răspîndită în tot organismul ser, salivă, secreţie nazală, lapte, plămîni, rinichi, fagocite etc.); în serul sanguin se găseşte într-o concentraţie de 8—20 mg/l. Acţiunea sa antimicrobiană se manifestă, fie prin producerea de aglutinare, fie prin liză a membranei microbiene la nivelul mucopeptidelor (ruptura legăturilor 1—4 a N-acetil-glucozaminei şi a acidului N-acetil-muraminic). Lizozimul are şi o acţiune bacteriostatică datorită perturbării mecanismelor de oxidoreducere respiratorie pe suprafaţa acestora (294 a).

c) *Interferonul* reprezintă, în sens larg, un grup de enzime cu acţiune inhibantă în multiplicarea virusurilor; unele vieţuitoare simple (mucegaiuri) pot produce interferonul (249).

d. **Consecinţele reacţiilor imune.** În mod normal organismul nu elaborează anticorpii împotriva propriilor celule (nu se imunizează contra propriilor antigene), fenomen numit „autorecunoaştere". Acest proces se instalează în viaţa intrauterină cînd aparatul imun ia act de „inventarul" de antigene proprii, pe măsură ce acestea se dezvoltă, fază în care organismul poate să accepte, ca proprii, unele substanţe străine; fenomenul este denumit *toleranţă imună;* tot un gen de toleranţă este şi paralizia imună.

Conflictul antigen-anticorp se traduce printr-o gamă largă de răspunsuri imune. Dintre efectele biochimice la nivelul membranelor eritrocitare, unele produc alterări fără consecinţe grave, alteori se produce o alterare a componentelor lipo-proteice din stratul exterior al membranei eritrocitare, eritrocitele astfel lezate fiind apoi fagocitate, iar în alte împrejurări alterarea membranei este atît de profundă încît nu mai este în stare să reţină conţinutul intraeritrocitar, fenomen în care intervine şi complementul.

1) *Fenomenul de agregare; aglutinarea eritrocitară.* Complexul antigen-anticorp poate duce la modificarea stării de dispersie a suspensiei. Devenit insolubil, el determină o opalescenţă, după care agregatele se separă de faza lichidă rezultînd precipitatul (în partea declivă a tubului) şi lichidul supernatant clar (pentru a grăbi acest fenomen se poate recurge la centrifugare). Aglutinarea este tot un fenomen de agregare, în care alternanţa antigenelor cu anticorpii (care dispun de cel puţin două zone combinative), determină formarea unor reţele întinse. Hemaglutinarea (aglutinarea eritrocitelor) diferă calitativ după forţa de legare a anticorpilor: mai puternică în sistemul ABO (imposibil de disociat prin agitare) şi mai slabă în sistemul Rh sau în alte sisteme, cînd

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 7-22. Eritrocite aglutinate de un antiser de grup sanguin (după M. Bessis, 1966).

Pe suprafaţa eritrocitelor se văd conglomerate sub formă de „cratere", rezultate din combinarea antigenelor cu anticorpii, care alterează structurile nespecifice care nu iau parte directă la procesul imun (structurile lipoproteice alterate se transformă în figuri mielinice); acestea devin puncte de plecare a formării unor fibre de aglutinare. În cursul aglutinării suprafaţa eritrocitelor devine vîscoasă şi adezivă încît se lipeşte uşor de diverse obiecte, de exemplu de lama de sticlă (microscopie electronică după umbrire; mărire de 12 000×).

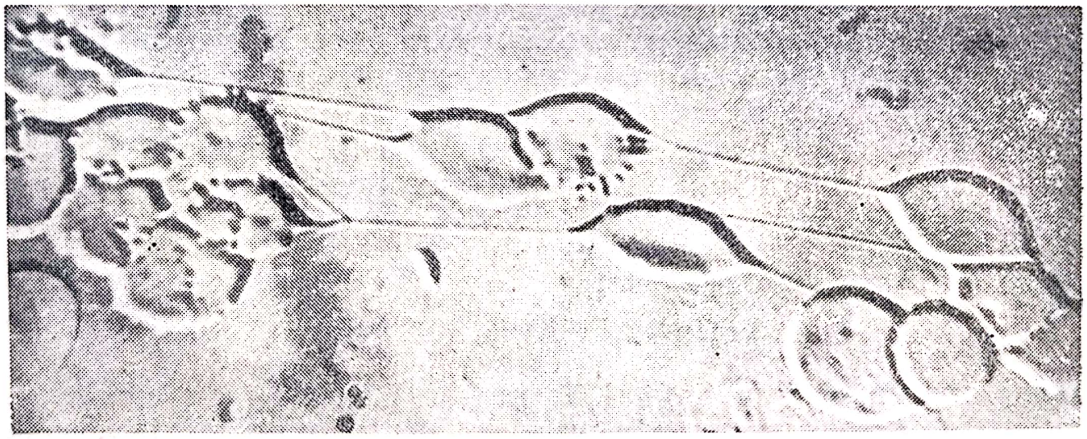


Fig. 7-23. Eritrocite aglutinate de un antiser de grup sanguin, examinate în stare vie (după M. Bessis, 1966).

Procesul de aglutinare nu se confundă cu cel de coagulare întrucît firele care leagă eritrocitele între ele nu sînt formate din fibrină. La formarea lor nu intervin factorii coagulării, ci substanţe lipo-protidice ale membranei eritrocitare, apărute cu ocazia pierderilor de apă şi electroliţi, determinate de însuşi procesul imunologic. Dacă se încearcă smulgerea unui eritrocit dintr-o masă de eritrocite aglutinate, acestea devin fuziforme sau se dispun în şirag, iar dacă numărul firelor care imobilizează eritrocitele este mai mare, ele iau o formă stelată. Prin continuarea acţiunii de smulgere, firele se întind pînă la o lungime de 20—30μ, deformînd şi mai mult eritrocitele. La întinderi şi mai mari, aceste fire se rup şi se răsucesc; ele sînt animate de mişcări browniene (vezi şi figurile mielinice, pag. 172).

Scanned with OKEN Scanner

disocierea este relativ ușoară. Anticorpii joacă rolul de puncți de legătură între antigenele ce se unesc din aproape în aproape realizînd agregate voluminoase, vizibile cu ochiul liber. „Craterele" de pe suprafața eritrocitelor, care reprezintă zone cu o densitate lipidică mare, devin punctele de plecare ale unor fire de aglutinare (fig. 7-22). Aceste fire nu sînt formate din fibrină, ci, probabil, din substanțe lipoproteice ale membranei eritrocitare și ale plasmei sanguine, apărute cu ocazia pierderilor de apă și electroliți, determinate de înseși procesul imun (fig. 7-23). Anumiți factori externi, ca temperatura, concentrația ionilor de hidrogen (pH), sărurile etc. intervin în faza a doua a procesului de agregare, diminuînd și mai mult hidrofilia și accentuînd unirea particulelor sensibilizate.

2) *Fenomene hemolitice.* Hemoliza „intravasculară" cu pierderea hemoglobinei din membrana „ciuruită" de orificii largi, este forma cea mai gravă de alterare eritrocitară. Conflictul antigen-anticorp nu este însă capabil să ducă spontan la astfel de alterări, fiind necesară participarea complementului.

În prima fază a alterării se produce o pierdere a permeabilității selective (alterarea pompei ionice, vezi pag. 263), cu tendință la egalizarea intra- și extraeritrocitară a K^+ și Na^+. Ulterior eritrocitul pierde substanțele organice cu moleculă mică (glucoză, nucleotide), iar apoi este părăsit și de către moleculele mari (hemoglobină, enzime). Prin creare de „contraforturi" (albumină serică în proporție de 25—30%), se reușește să se întîrzie exodul macromoleculelor dar nu și al micromoleculelor (contrabalansarea presiunii coloid-osmotice intracelulare).

Umflarea eritrocitelor la acțiunea proceselor imune, în care intervine și complementul, rezultă din efectul Donnan, observat la membranele semipermeabile. Cum concentrația proteică din interiorul eritrocitelor este mai mare decît a serului sanguin, sărurile și apa pătrund prin orificiile create de complement la nivelul „inelelor" proteice alterate. În prima fază, aceste orificii sînt prea mici pentru ca însăși hemoglobina să poată părăsi eritrocitul (10 nm), ulterior se realizează lărgirea acestor orificii, vizibile și la microscopul electronic (vezi fig. 3-16). Eritrocitele care sînt eritrocite rigide întrucît au pierdut porțiuni importante de membrană, sînt instabile din punct de vedere osmotic; ele hemolizează prin mecanism coloid osmotic, cît și prin fagocitare (341).

2. NOȚIUNI DE IMUNOGENEZĂ

Fenomenului de imunitate și de toleranță imună i s-a consacrat în ultimele 2—3 decenii un număr mare de lucrări experimentale, soldate cu lămurirea a numeroase probleme teoretice, precum și cu unele posibilități de aplicare practică.

Efectorii reacțiilor imune sînt umorali (molecule de anticorpi secretate de imunocite) și celulari (acțiune directă a unor celule asupra antigenelor). Răspunsurile imune umorale și celulare au, fiecare, mai multe modalități de acțiune.

a. **Substratul morfologic al aparatului imun.** Răspunsul imun are la bază un aparat răspîndit difuz, format din organe și celule ce aparțin

„SRH". Sistemul este într-o strînsă cooperare funcțională; unele celule acționează prin fagocitare (monocitele, polinuclearele), altele prin sinteze (plasmocitele), iar altele prin acțiune celulară directă (unele limfocite), scopul final fiind anihilarea „agresorului".

Organele limfoide sînt alcătuite dintr-o asociere celulară în care, pe lîngă limfocite, coexistă, pe de o parte celule epiteloide, iar pe de altă parte celule reticulohistioide (retoteliale) (20, 74).

1) *Țesutul limfo-epitelial* este reprezentat, pe de o parte de timus, iar pe de altă parte de organe echivalente bursei Fabricius.

a) *Timusul* este alcătuit dintr-un masiv epitelial populat de limfocite, fără structură foliculară. El este primul organ limfoid al embrionului; abia după un interval apreciabil apare țesutul limforetotelial (organele limfoide secundare). În acest interval splina are rol de organ hematopoietic general (fig. 2-3). Tot timusul este primul organ limfoid care involuează.

Timocitele sînt răspunzătoare de imunitatea de tip celular (expulzia grefei, reacția grefă contra gazdă, protecția individului împotriva dezvoltării de tumori etc.). Rolul timusului în dezvoltarea funcției imunitare a celulelor limfoide este esențial întrucît asigură, în calitate de organ limfoid primar, popularea organelor limfoide periferice.

Celulele derivate din timus se numesc timocite, limfocite timo-dependente sau limfocite T. Timectomia neonatală (înainte de „periferizarea" limfoidă) are ca rezultat absența sau scăderea considerabilă a limfocitelor din circulație și din organele limfoide periferice, în timp ce plasmocitele, în țesuturi și imunoglobulinele, în serul sanguin, sînt normale (imunitate umorală intactă); prezența timusului la vîrsta adultă nu este necesară pentru menținerea limfocitelor de origină timică. Absența ereditară a imunității celulare se întîlnesc în *sindromul de deficiență timică Di George* (1965).

Unii autori sînt de părere că timusul ar induce o competență, nu numai direct, prin intermediul limfocitelor prin pasaj timic, ci și indirect, prin intermediul unui factor de maturare umoral numit timozina (216).

b) *Bursa Fabricius.* La păsări, în afară de timus, există un alt organ limfoepitelial, anexă a tubului digestiv terminal (zona dorsală cloacală) numită bursa Fabricius. Limfocitele produse de acest organ, notate cu majuscula B, sînt denumite bursocite sau limfocite burso-dependente. S-a căutat să se găsească un corespondent funcțional al bursei și la mamifere, dar pînă în prezent concluziile cercetărilor sînt contradictorii; unii atribuie acest rol organelor limfoide anexe tubului digestiv (fapt cert la iepure), iar alții nodulilor limfatici ai măduvei osoase (Bone marrow) motiv pentru care autorii englezi păstrează aceeași nomenclatură (celule B); autorii francezi mai utilizează și termenul de celule M (moëlle osseuse).

Bursocitele sînt răspunzătoare de răspunsul imun umoral; ele sînt capabile de a reacționa prin anticorpi la unele antigene. Deficitul congenital al imunității umorale se întîlnește în *sindromul Bruton* (1952), caracterizat prin absența imunoglobulinelor serice și absența plasmocitelor în țesuturi, rejecția grefei efectuîndu-se în mod normal. Aceleași fenomene se observă și după ablația bursei la păsări.

Ambele organe limfoide primare, capabile să „instruiască" limfocitele medulare, proliferează fără stimulare antigenică și, spre deosebire de organele limfoide secundare, nu posedă nici centri germinativi, nici plasmocite (319) (fig. 7-24).

2) *Țesutul limfo-retotelial* reprezintă o combinație de celule limfoide cu celule reticulare și histiocitare (retoteliale). Acest țesut predomină în ganglioni, foliculii splenici, în porțiunea limfo-retotelială a țesutului limfoid, submucoase etc. Spre deosebire de țesutul limfo-epitelial, care suferă o involuție, odată cu avansarea în vîrstă, țesutul limforetotelial persistă toată viața.

Scanned with OKEN Scanner

3) *Celulele limfoide.* Limfocitele mici din sîngele periferic (celule „adulte" sau de sfîrşit de serie ale autorilor clasici), deşi formează, aparent, o populaţie omogenă, reprezintă un amestec de celule limfoide medulare, unele neangajate încă în procesul imun (celule „virgine") alături de altele efectoare, răspunzătoare de imunitatea celulară (limfocite T) şi de imunitatea umorală (limfocite B). Puse în medii de cultură şi sti-

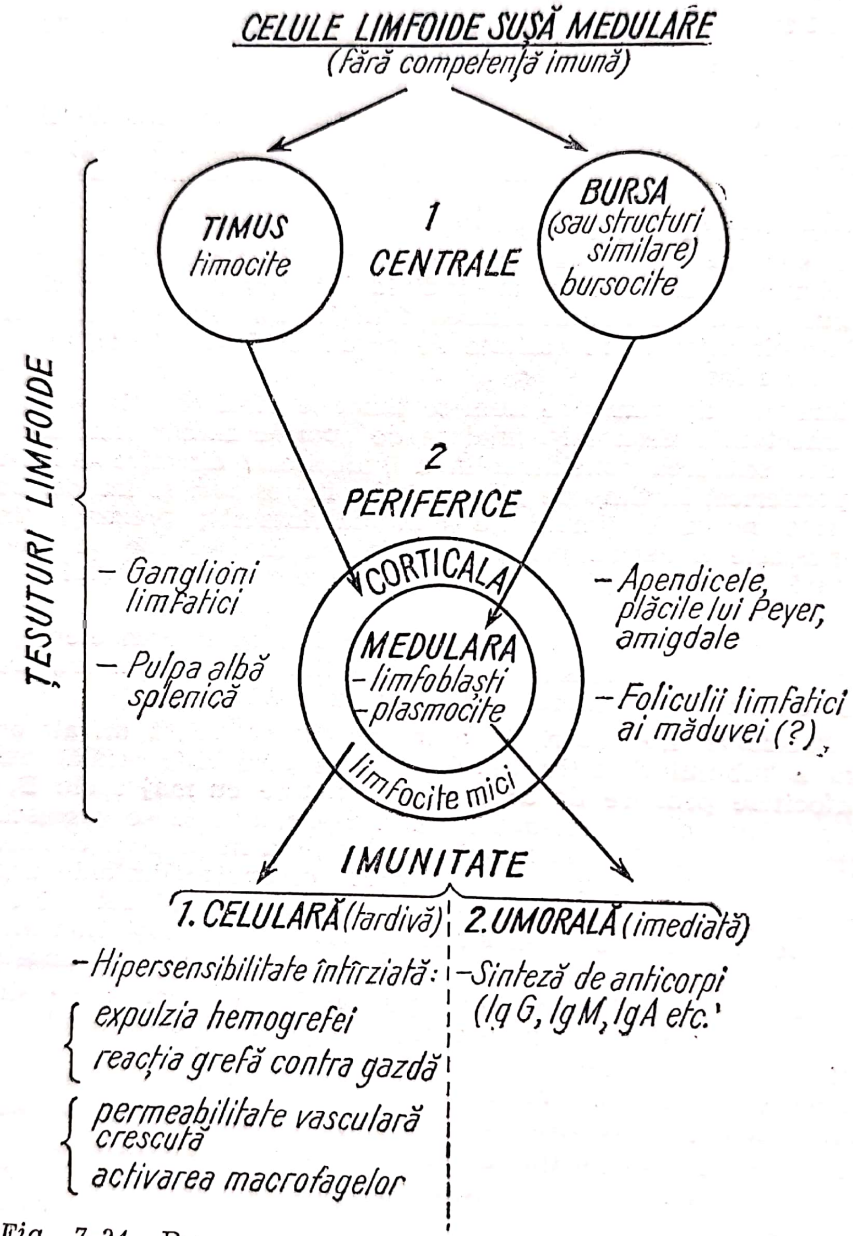


Fig. 7-24. Reprezentare intuitivă a sistemului imunităţii cu cele două tipuri de imunitate: celulară şi umorală (după F. Daguillard, 1970).

mulate antigenic, ele pot suferi o transformare blastică, adică pot deveni celule cap de serie limfoidă, ceea ce dovedeşte că nu toate sînt celule de sfîrşit de serie (fig. 7-25).

a) *Celule fără competenţă imunologică.* Astăzi se cunoaşte că toate celulele limfoide iau naştere în măduva osoasă. Aceste limfocite sînt însă lipsite de competenţă imunologică, fiind necesară „instruirea" lor în organele limfoide primare: timus şi bursa Fabricius (sau a echivalentelor sale). Un argument în favoarea acestei afirmaţii îl constituie *sindromul de hipogamaglobulinemie limfogenică* a copilului în care există un deficit al ambelor tipuri de imunitate, celulară şi umorală şi de unde grefa de măduvă osoasă corectează ambele sisteme.

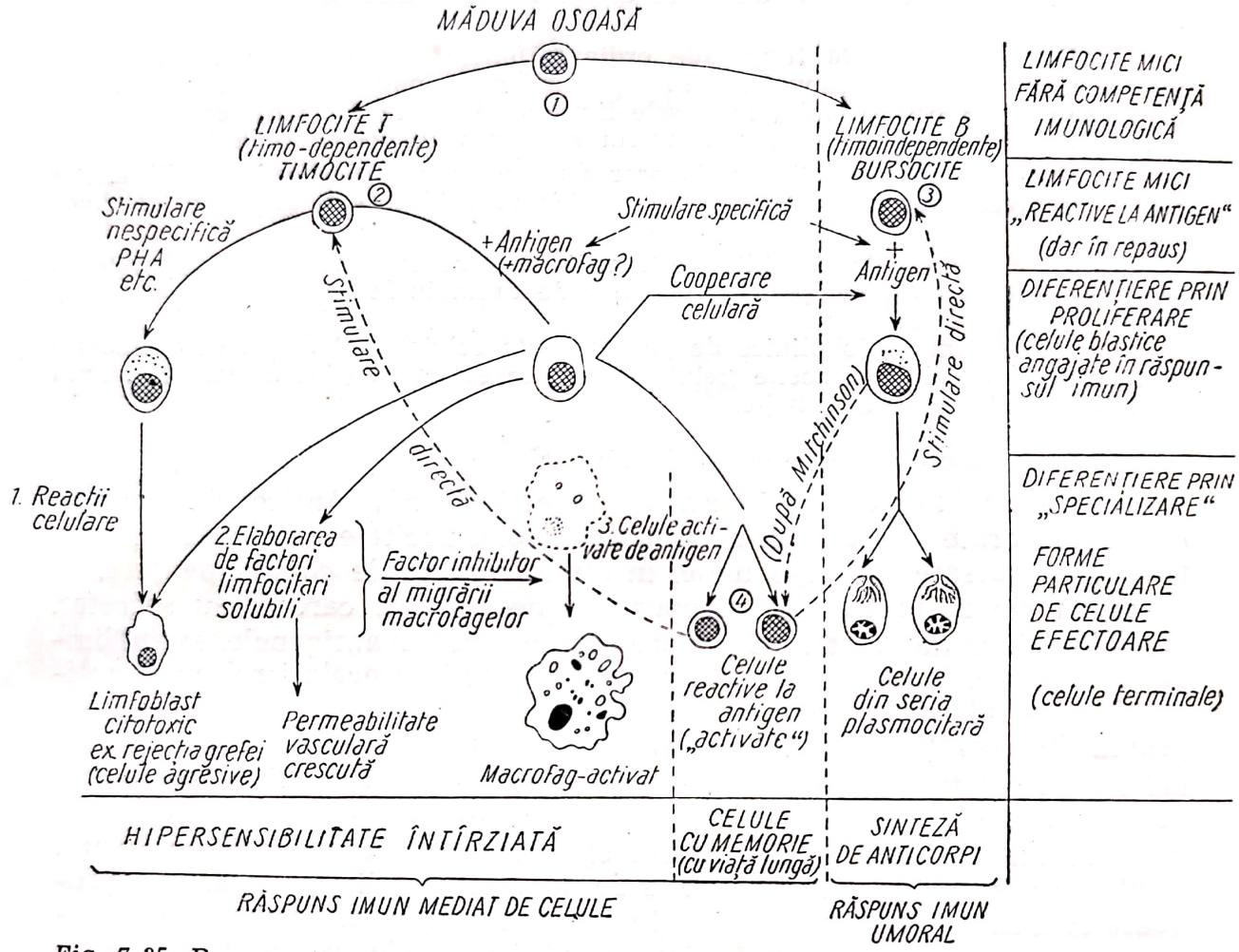


Fig. 7-25. Reprezentare intuitivă a tipurilor de limfocite şi rolul jucat de acestea în imunitate. Sub această omogenitate morfologică se ascunde o heterogenitate funcţională.

b) *Celulele cu potenţial de activare sau imunocompetente* sînt capabile să reacţioneze la un antigen oarecare, fără să fi fost în prealabil sensibilizate de către acesta antigenic. Funcţional ele pot fi atît timodependente cît şi timoindependente, iar morfologic nu se deosebesc între ele. Fără stimularea antigenică acestea nu sînt capabile să efectueze un răspuns imun adecvat.

c) *Celulele activate sau „instruite"* (comitted cells) sînt celulele angajate în răspunsul imun (celular sau umoral). Ca şi pentru seria mieloidă — unde pentru a ajunge la elemente figurate sanguine celulele blastice trec prin etapa proliferării şi a maturării — limfocitele mici inerte, stimulate de antigene, se angajează într-o serie de mitoze şi maturări nemitotice pînă ajung la stadiul de celule finite. *Transformarea blastică* reprezintă prima etapă a diferenţierii celulelor T sau B încă neactivate. Limfocitele B se diferenţiază în urma unor stimuli antigenici spe-

cifici, pe cînd limfocitele T răspund atît la stimuli antigenici specifici, cît și nespecifici (ca fitohemaglutina, concavalina, streptolizina, filtratele stafilococice, serul antilimfocitar etc.). În urma stimulului antigenic specific sau nespecific urmează un număr de mitoze (circa 7—8) după care începe maturarea nemitotică.

d) *Celulele terminale sau producătoare de anticorpi.* Celulele efectoare, provenite din echivalentele bursei, sînt predominant plasmocite. Se știe că acestea au o citoplasmă bogată, bazofilă și un reticul endoplasmic rugos (ribozomial) foarte dezvoltat, cu capacitate mare secretorie; ele sînt producătoare de anticorpi (gamaglobuline). Celulele efectoare, originare din timus, sînt diferite, atît morfologic cît și funcțional:

— *limfocite cu viață lungă* (de ordinul lunilor sau anilor) sau celule „cu memorie", purtătoare a răspunsului imun secundar, anamnestic sau întîrziat; ele se răspîndesc în tot organismul (din vasele limfatice în sînge, apoi în țesuturi și din nou în vasele limfatice) fenomen cunoscut sub termenul de *recirculație;*

— celule limfoide capabile de elaborarea unor *factori limfocitari solubili,* dintre care unii cresc permeabilitatea vasculară, iar alții blochează migrarea celulelor macrofage;

— celulele limfoide capabile de reacții celulare cu rol citotoxic numite și *celule agresoare* sau „ucigașe" (killer cells), de exemplu în acțiunea de rejecție a grefei de către gazdă.

Structurile imunoglobulinice de pe suprafața celulelor T diferă de imunoglobulinele secretate de plasmocite (celule B) atît ca structură (sînt constituite numai din lanțuri grele) cît și ca funcție.

b) Mecanismele răspunsului imun

1) *Imunitatea umorală și celulară.* Anticorpii sînt molecule elaborate de celule necirculante (plasmocitele măduvei osoase), fiind apoi vărsate în sînge unde, întîlnind antigenele complementare, se unesc cu ele anihilîndu-le, independent de celulele care le-au secretat. Spre deosebire de acest mod eficace de a neutraliza antigenele, există limfocite care conțin pe suprafața lor receptori ficși cu același rol cu al anticorpilor circulanți. Acești anticorpi fixați pe suprafața limfocitelor nu provin din secreția altor celule, ci sînt elemente structurale ale membranei lor. Acest tip de imunizare a apărut primul în evoluția filogenetică, păstrîndu-se și după dezvoltarea imunității umorale. Limfocitele capabile de imunitate celulară se deplasează spre locul unde se află antigenul, combinarea făcîndu-se cu situsurile de pe suprafața limfocitară. Aici provoacă reacția de hipersensibilitate locală de tip întîrziat cu anumite caracteristici (bine cunoscute încă din secolul trecut, de exemplu reacția la tuberculină).

2) *Cooperarea celulară în elaborarea răspunsului imun.* Pătrunderea în organism a unei substanțe străine declanșează un răspuns imun primar și altul secundar, la care ia parte un număr mare și variat de celule din ambele tipuri de imunitate, care se potențează unele pe altele. La răspunsul imun primar cooperează trei tipuri de celule: celula macrofagă, celula reactivă la antigen (T sau B) și celula efectoare (descinsă și ea, fie din limfocitul T fie B). La răspunsul imun secundar cooperează două tipuri de celule: limfocitul cu memorie (T) și limfocitul diferențiat B (plasmocit) (fig. 7-26). Răspunsul imun secundar este mai rapid și mai intens decît cel primar (celulele care iau parte la el fiind gata sensibilizate); limfocitul cu memorie, după cum s-a văzut, este

Scanned with OKEN Scanner

capabil să reacţioneze direct cu antigenul, evitînd informarea macrofagelor.

a) *Rolul celulei macrofage în stimularea răspunsului imun.* Primul timp al imunizării constă din contactul „corp la corp" dintre celula fagocitantă şi celula limfoidă sensibilă la antigen. După înglobarea antigenului în citoplasma celulei macrofage, aceasta îl degradează protejînd to-

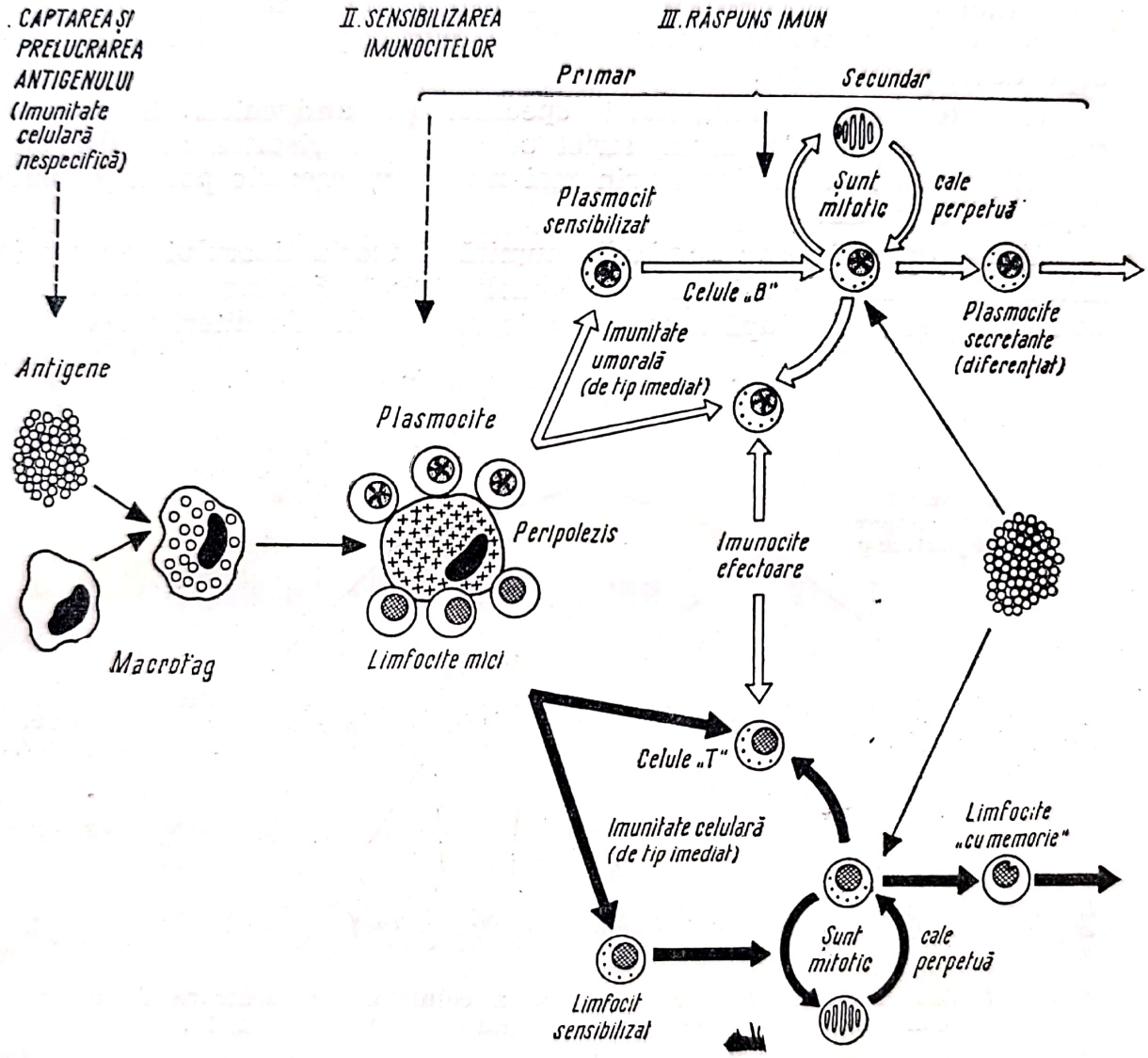


Fig. 7-26. Etapele de diferenţiere şi interacţiunile dintre celulele limfoide în cursul răspunsului imun (după I. M. Roitt şi colab., 1969, modificat de N. Pozsgi, Gr. Ghyka, 1974 şi de autor).

tuşi cîteva mostre antigenice specifice (digestie limitată), spre deosebire de polinucleare care distrug întreg antigenul. Celulele fagocitante sînt înconjurate de celule limfo-plasmocitare, fenomen cunoscut sub denumirea de *peripolesis*. Cînd aceste celule pătrund în înseşi „meandrele" macrofagelor, fenomenul se numeşte *emperipolesis*.

Scanned with OKEN Scanner

b) *Cooperarea între limfocitele timo-dependente și burso-dependente.* În răspunsul imun, pentru anihilarea unui antigen ia parte un anumit anticorp, care este un „antidot" specific, elaborat de o anumită clonă celulară. Celulele care țin evidența agresorilor cu antecedente de penetrare în organism sînt celule „cu memorie" (de tip T). Acestea, instruite cu ocazia unui prim contact antigenic (în cursul răspunsului imun primar) și avînd o viață mai lungă, acționează, atît direct asupra antigenului (în calitate de celule agresoare), cît și stimulînd un număr mare de celule bursodependente (nediferențiate, cu viață scurtă), precum și celule timodependente precursoare.

c. **Ipoteze ale diversificării specificității antigenice.** Stimularea specifică a răspunsului imun, strict adaptat la varietatea considerabilă de antigene, a fost explicată prin mai multe ipoteze; ele pot fi grupate după cum urmează:

1) *Teoria instructivă,* numită și teoria tiparului sau teoria informatică, a fost argumentată de Gamelia (1933), Pauling (1940), Haurowitz (1952) și alții. După această teorie antigenele, de diferite specifici-

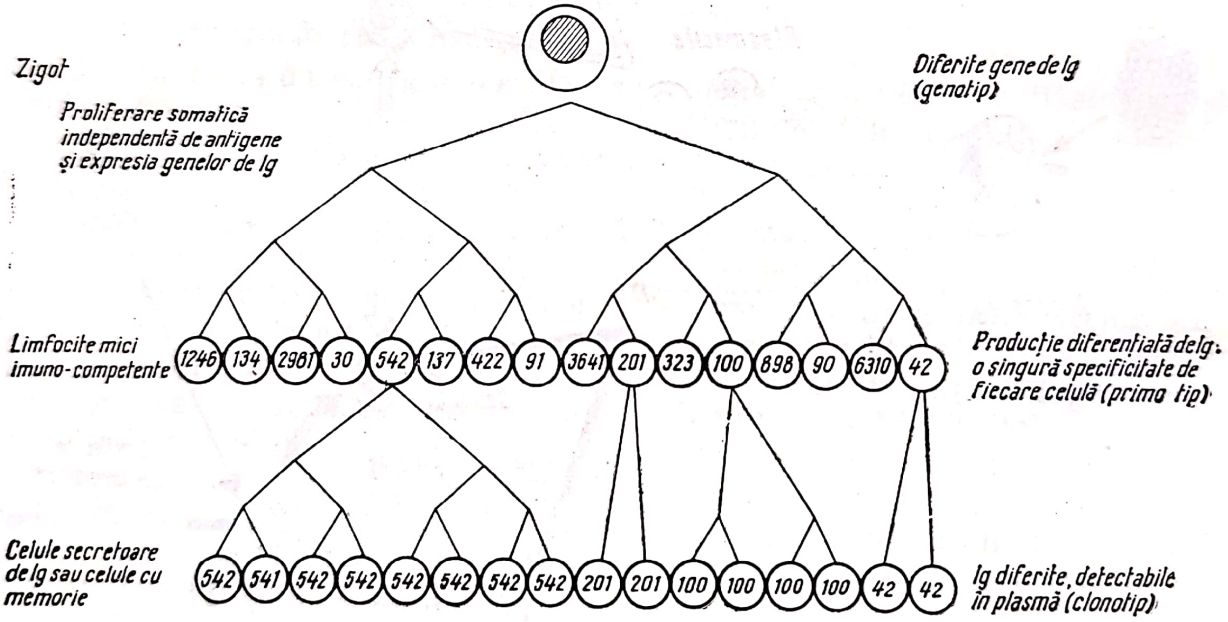


Fig. 7-27. Model de diferențiere somatică a celulelor producătoare de anticorpi conform teoriei selecției clonale (după G. D. Edeiman, 1973).

Numărul genelor imunoglobulinelor crește o dată cu dezvoltarea somatică, astfel că, la animalul matur, din punct de vedere imunologic, sînt formate diferite celule limfoide, fiecare sintetizînd un anumit tip de anticorpi (indicat în figură prin numere arabe). Acest model cuprinde atît celule derivate din măduva osoasă (celule tip B) cît și celule derivate de timus (T).

tăți, ar fi în măsură să inducă sinteza de anticorpi „instruind" celula imunocompetentă; cu alte cuvinte, antigenele ar fi cele care ar modela corespunzător situsul combinativ molecular sau celular. Această teorie nu explică fenomenul „memoriei imunologice", iar pe de altă parte ar impune prezența îndelungată a antigenului în organism.

2) *Teoria selecţiei clonale* (sau teoria predestinării) emisă de Burnet în 1957, preconizează existenţa în organism a unei largi varietăţi de structuri preexistente (toţi anticorpii posibili), fiecare celulă putînd sintetiza un singur tip de anticorp cu o specificitate fixă pentru un anumit antigen. În timpul vieţii embrionare s-ar elimina acele clone celulare care sînt destinate pentru sinteza unor anticorpi care ar fi îndreptaţi împotriva antigenelor ţesuturilor, proprii (clone interzise). În acest sens, numărul variantelor clonale care să anihileze antigenele ar fi foarte mare (peste 50 000), chiar dacă situsurile combinative nu ar necesita mai mult de 6 acizi aminaţi (fig. 7-27).

Această teorie explică bine autorecunoaşterea propriilor structuri (toleranţa imunologică) şi fenomenul de rejecţie a homogrefelor.

Însuşi Burnet şi-a revizuit în 1964 această teorie în sensul că numărul mare de celule cu receptori specifici nu ar apărea la naştere, ci ar rezulta în urma unor mutaţii somatice rapide la nivelul organelor formatoare de anticorpi.

O altă variantă a acestei teorii susţine că în genomul tuturor celulelor ar fi înscrisă informaţia pentru toate tipurile de anticorpi în stare reprimată (celule pluripotente sau celule „enciclopedice"), antigenele jucînd rolul de inductori ai porţiunii genice corespunzătoare pe care le-ar derepresa prin inactivarea represorilor.

C. CATABOLISMUL HEMOGLOBINEI ŞI BIOSINTEZA PIGMENŢILOR BILIARI

Catabolismul hemoglobinei are loc atît extravascular (intracelular) cît şi intravascular (fig. 7-28). Prin distrugerea membranei eritrocitare, hemoglobina pusă în libertate îşi pierde întîi capacitatea funcţională prin methemoglobinizare, dar se mai păstrează un timp legăturile dintre componentele sale (globina, protoporfirina şi fierul). Lipsa învelişului ei protector şi a mediului ambiant intraeritrocitar duce apoi la desfacerea acestor legături şi la catabolizarea componentelor hemoglobinice. Soarta ulterioară a hemoglobinei diferă după mediul în care este expulzată din stroma eritrocitară. Între hemoglobina eliberată în lichidul intracelular al fagocitului şi aceea eliberată direct în plasma circulantă există diferenţe multiple în ceea ce priveşte căile metabolice urmate.

1. CATABOLISMUL INTRAVASCULAR AL HEMOGLOBINEI

Hemoliza intravasculară apare cînd agresiunea asupra eritrocitului este de mare intensitate, provocînd o distrucţie acută a unei cantităţi importante de eritrocite în însăşi circulaţia sanguină (artere, vene, sinusuri sanguine). Eritrocitele fragilizate, nerezistînd la factorii hemolitici obişnuiţi din plasmă, dispar în cîteva minute, cu punere în libertate a he-

Scanned with OKEN Scanner

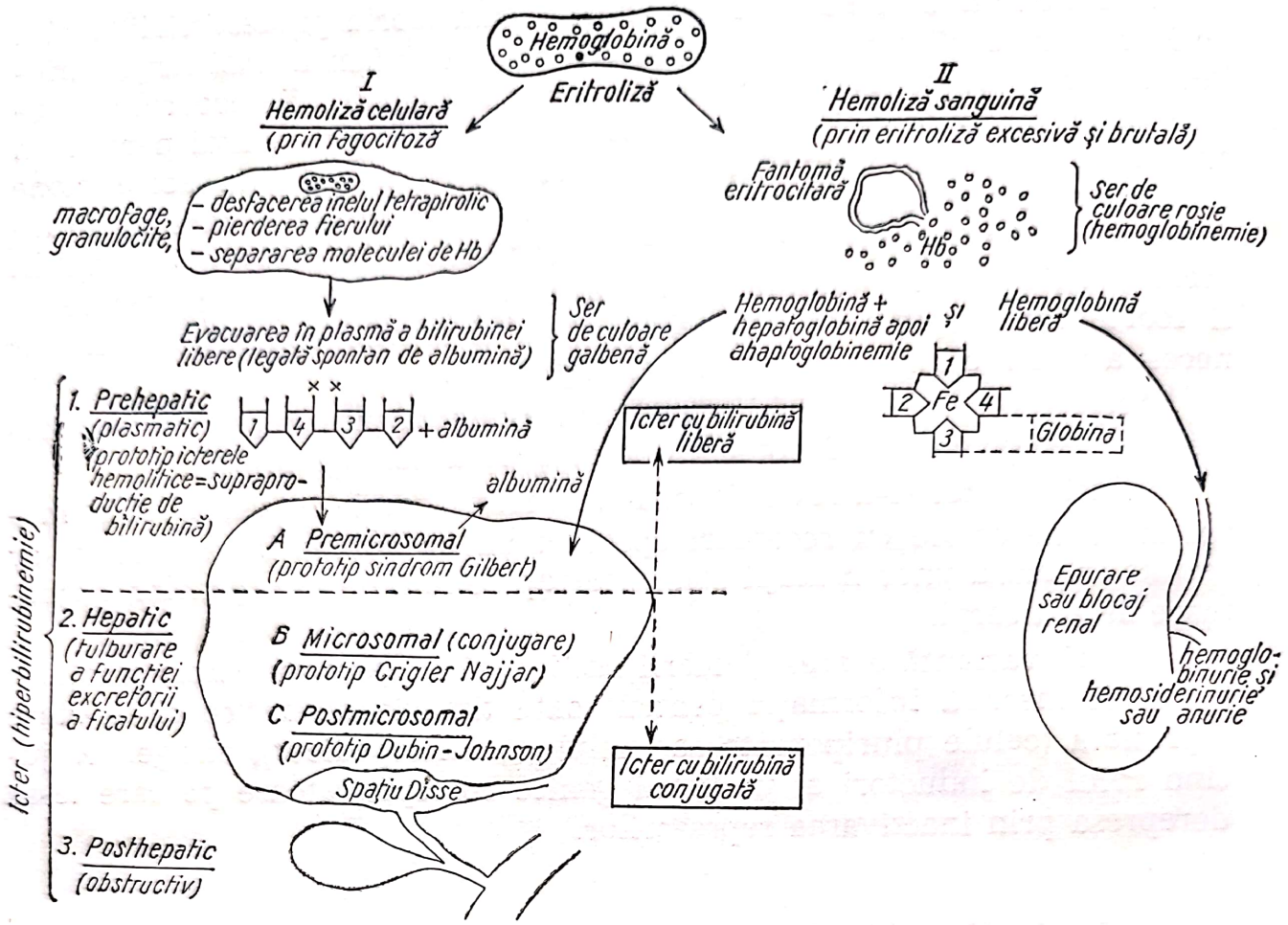


Fig. 7-28. Catabolismul hemoglobinic prin cele două căi hemolitice: celulară și sanguină (plasmatică).

În hemoliza intracelulară primul timp constă din desfacerea inelului tetrapirolic; prezența „liniară a porfirinei plasmatice" duce la apariția icterului (hiperbilirubinemie). Prin liza eritrocitelor circulante se păstrează ciclul porfirinic (hemoglobinemie și hemoglobinurie). Prezența bilirubinei la nivelul ficatului provine, într-o proporție de 70—90%, din degradarea celulară a hemoglobinei; în 10—30% bilirubina este de altă origine.
Icterele sînt provocate de tulburări de admisie, transport, conjugare și excreție de bilă. Ficatul este și el capabil de conjugarea unei cantități de 7 ori mai mari de bilirubină liberă față de condițiile fiziologice.

moglobinei, care, fără protecția stromală, devine o proteidă circulantă fără vreo funcție anumită.

Catabolismul hemoglobinei în hemolizele intravasculare se deosebește de hemolizele intracelulare prin mai multe faze catabolice:

— fixarea de către haptoglobină a unei părți din hemoglobina liberă circulantă;

— transformarea hemoglobinei în complexul hemoglobină-haptoglobină, apoi în methemoglobină, și în hematină (prin desfacerea de globină a tetrapirolilor cu Fe^{+++}); excesul de hematină se combină cu albumina devenind methemalbumină, care este captată de ficat și catabolizată în direcția bilirubinei;

— epurarea de către rinichi a hemoglobinei circulante, nelegată de haptoglobină, descompunerea ei în celulele tubulare renale, cu eliminarea urinară de hemosiderină; cantitatea de hemoglobină liberă care

depăşeşte acest mecanism este eliminată ca atare în urină (hemoglobinurie).

a. **Circulaţia sanguină a pigmenţilor hemoglobinici**

1) *Hemoglobinemia.* În condiţii normale, în care hemoliza se produce predominant în celule macrofage, nivelul plasmatic al hemoglobinei este foarte scăzut (2—5 mg/l de plasmă). În cazurile în care hemo-

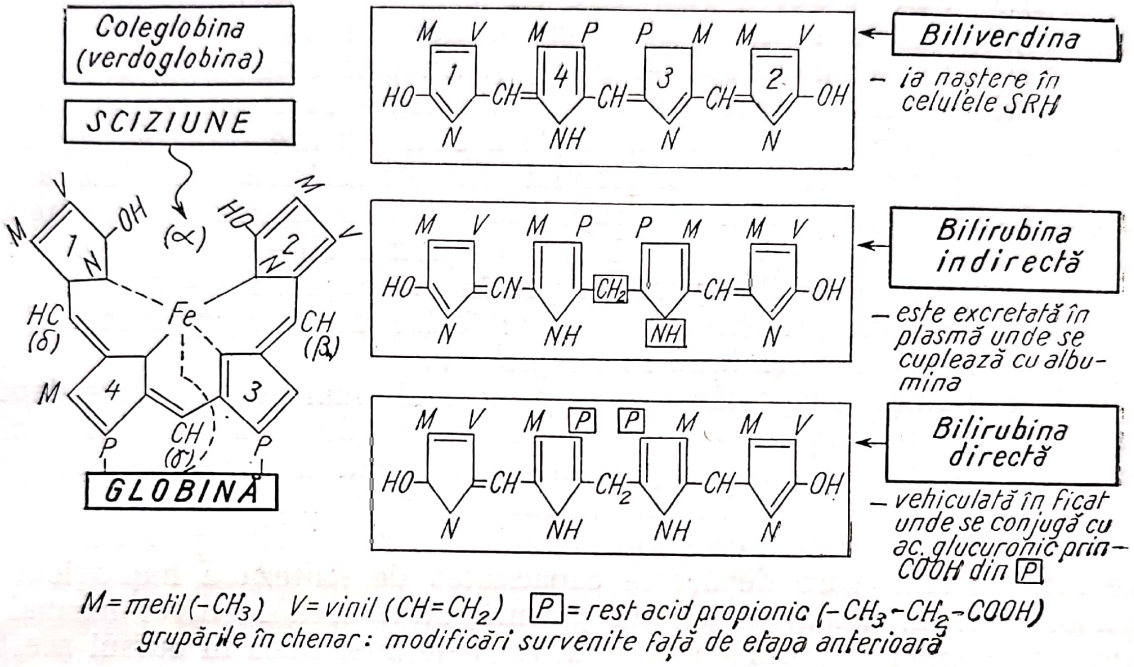


Fig. 7-29. Transformarea coleglobinei sau verdoglobinei (hemoglobină cu ciclul tetrapirolic desfăcut), în bilirubină.

Deşi componenţa tetrapirolică a coleglobinei are o structură lineară, ea păstrează legăturile cu globina şi cu fierul; ionul feros este necesar pentru deschiderea inelului tetrapirolic; în etapele următoare coleglobina este decuplată de globină dînd naştere bilirubinei; coleglobina reprezintă primul pigment biliar intermediar linear ce conţine încă punţi de legătură meten; biliverdina, formată prin oxidarea punţii centrale meten (=C—), în punte metil (—CH_2—), este transformată în bilirubină, formă sub care pigmentul liber părăseşte celulele macrofage şi apare în plasmă.
În bilirubina directă acidul glucuronic se leagă, la nivelul ficatului, de cele două grupări carboxil ale radicalilor acid propionic al bilirubinei, realizînd diglucuronidul bilirubinic (majusculele P şi P în chenar).

liza are loc direct în sistemul circulator, hemoglobina eliberată în plasmă poate depăşi capacitatea de saturare a haptoglobinei plasmatice, care este de 100—150 mg Hb/1 000 ml plasmă, ajungînd să circule pînă la valori de 200 mg ‰ sau chiar mai mult. În aceste cazuri plasma capătă o culoare roză sau chiar roşie, în funcţie de concentraţia hemoglobinei. Cînd concentraţia este moderată (pînă la 40 mg%), această culoare poate lipsi, fiind marcată de culoarea altor pigmenţi (bilirubină, methemalbumină).

2) *Methemalbuminemia.* În cazurile în care se produc mari concentraţii de hemoglobină plasmatică, o parte din hem (sub formă oxidată de hamatină) (Fe^{+++}) se combină cu albumina formînd methemalbumina. Punerea ei în evidenţă se face spectrofotometric. Ea este preluată de ficat unde este transformată şi excretată sub formă de bilirubină. Dacă se

află în cantitate mare, methemalbumina se elimină în urină căreia îi imprimă o culoare maronie; ea poate fi identificată biochimic prin reacția Schumm (52).

b. **Proteinele de legare a hemoglobinei.** În plasma sanguină (în afara albuminei nespecifice) există două proteine specifice cu rol transportor care se combină cu hemoglobina, respectiv cu hemul: haptoglobina și hemopexina.

1) *Haptoglobina* (Hp) este un termen care denumește în realitate un grup de mai multe α-globuline. Concentrația normală a haptoglobinei plasmatice este de 100—150 mg%. Ea este sintetizată, cît și distrusă, probabil în ficat; nivelul ei sanguin scade în insuficiențele hepatice; timpul ei de înjumătățire este de 2 zile. Hp are proprietatea de a se combina ireversibil cu hemoglobina extraeritrocitară, care este astfel transportată și metabolizată mai rapid decît dacă s-ar afla în stare liberă. Relația dintre cele două molecule în complexul Hb—Hp este de 1 : 1; acest complex este stabil și poate fi pus în evidență printr-un reactiv cu benzidină (datorită proprietăților peroxidazice ale hemoglobinei). Haptoglobina nu se poate combina cu mioglobina.

Din combinarea Hp—Hb rezultă o moleculă mare ce nu poate depăși pragul renal. Cînd Hb apare în exces în plasmă (după saturația Hp), molecula hemoglobinei, avînd o greutate moleculară de 65 000, trece prin filtrul renal apărînd astfel hemoglobinuria. În cursul hemolizelor intravasculare, Hp disponibilă este consumată de către Hb eliberată din eritrocite într-un ritm care depășește capacitatea de sinteză a haptoglobinei ceea ce duce la dispariția ei din plasmă. Revenirea la nivel normal a haptoglobinemiei necesită un interval de 3—6 zile. Dacă în cursul acestei ahaptoglobinemii se produce un nou puseu hemolitic, chiar de mică intensitate, hemoglobina liberă este excretată în întregime prin rinichi. Hp este scăzută în plasmă în cazurile de hemoliză cronică, chiar în afecțiunile în care acest proces nu este intens, ca de exemplu în anemia pernicioasă (91).

Cînd Hp liberă lipsește din plasmă sau cînd este mult scăzută, Hb în exces are trei alternative de metabolizare: disociere în hem și globină (fierul hemic devenind trivalent), captare la nivelul ficatului (prin mecanism de pinocitoză de către macrofage) și excreție renală.

La scurt timp după descoperirea haptoglobinei s-a remarcat heterogenitatea ei. Sinteza acestei proteine este controlată de două alele (Hp1 și Hp2) situate pe o genă autosomală. Din combinarea lor rezultă trei genotipuri, două homozigote (Hp1/Hp1 și Hp2/Hp2) și unul heterozigot (Hp1/Hp2) cărora le corespund trei fenotipuri. Din sudarea a două gene au rezultat alele noi ale căror proteine au dimensiuni duble sau triple față de alelele originale. Afară de aceste varietăți ereditare au fost descoperite cazuri în care lipsește complet această proteină (ahaptoglobinemie). Variații ale concentrației de haptoglobină au fost descrise și în infecții, afecțiuni hepatice, neoplasme etc. (139).

2) *Hemopexina* este o β_1-globulină cu o greutate moleculară de 80 000 și o constantă de sedimentare de 4,8 U.S. Purificată, constă din două componente, I și II; componenta I este un monomer, pe cînd componenta II este un polimer ce migrează electroforetic pe mai multe benzi.

Scanned with OKEN Scanner

Nivelul concentrației hemopexinei la persoanele adulte este de circa 80 mg% plasmă.

Hemopexina are proprietatea de a se combina cu hemul pe care-l sustrage după ce fierul hemoglobinic a devenit trivalent. Pentru această combinație ea intră în competiție cu albumina, față de care are o afinitate mai mare. Cînd concentrația methemoglobinei depășește 20 mg% se realizează saturația hemopexinei, iar methemoglobina în exces se leagă de albumină în complexul hematină-albumină de culoare șocolatie, caracteristică în marile crize hemolitice: hemoglobinurie paroxistică, malarie, septicemia cu clostridium perfringens, pancreatite acute (în care sîngele din pancreas este hemolizat de către enzimele proteolitice) etc.

c. **Eliminarea urinară a pigmenților hemoglobinici**

1) *Hemoglobinuria.* După crizele de hemoliză intravasculară urinile pot fi de culoare roză, roșie sau maronie. Hemoglobina se elimină prin urină după saturarea haptoglobinei; ea avînd o greutate moleculară de 65 000, poate să traverseze glomerulii renali. Urina hemoglobinurică conține *oxihemoglobină* (de culoare roșie vie ce apare predominant în urinile alcaline) și *methemoglobina* (de culoare maronie, uneori negricioasă, ce apare prin autooxidare în urinile acide). Nuanța și intensitatea culorii urinii este în funcție de concentrația și de proporția celor doi pigmenți și, indirect, de gradul hemolizei. Aceste urini nu trebuie confundate cu urinile hipercolorate din ictere, porfirii, melanom sau după ingestie de medicamente (ca piramidon, fenolftaleină, sena, rifadin etc). Hemoglobina urinară poate fi identificată prin examen spectroscopic. Macroscopic, în hemoglobinurie, urina este clară, în timp ce în hematurie este tulbure; după centrifugarea urinii hematurice, supernatantul rămîne, în general, normal colorat, iar microscopic se constată un sediment eritrocitar bogat.

În unele cazuri de hemoliză intravasculară acută se poate ajunge la insuficiență renală acută prin necroză tubulară. Această stare se traduce, clinic, prin oligurie, pînă la anurie, cu uremie și uneori, sfîrșit letal, mai ales în hemolizele intravasculare prin transfuzie de sînge incompatibil (91).

2) *Hemosiderinuria.* În urma hemoglobinemiei și hemoglobinuriei se produce o depozitare a fierului în celulele tubilor renali. Hemosiderina se excretă în urină prin descuamarea celulelor tubulare; ea poate fi pusă în evidență prin colorația Perls. Hemosiderina urinară apare, în general, cînd hemoglobina plasmatică depășește 25 mg/100 ml.

2. CATABOLISMUL INTRACELULAR AL HEMOGLOBINEI

În cazul în care hemoliza nu se produce brutal, eritrocitele circulante, neviabile, sînt depistate de către fagocitele circulante.

Termenul de hemoliză extravasculară nu este fidel întrucît hemoliza prin fagocitoză se produce predominant în sinusurile măduvei, ficatului și splinei, unde sîngele, cu un conținut bogat în celule fagocitante, circulă foarte lent, iar pe de altă parte, fagocitoza din hemoliza intracelulară poate avea loc într-o oarecare

Scanned with OKEN Scanner

măsură chiar în curentul circulator prin intermediul granulocitelor și monocitelor (107, 117, 210)

a. **Bilirubinogeneza.** Succesiunea etapelor catabolismului extravascular al hemoglobinei este următoarea: desfacerea inelului tetrapirolic într-o moleculă lineară, pierderea fierului (care este apoi reutilizat pentru hematopoieză) și separarea hemului de globină (aceasta suferă și ea un proces de proteoliză ce merge pînă la stadiul de acizi aminați).

Primul produs intermediar între hemoglobină și bilirubină este coleglobina sau verdoglobina (fig. 7-29). Gruparea meten din poziția α (între primul și al doilea pirol) trece printr-o serie de etape intermediare.

b. **Transportul plasmatic al bilirubinei.** Bilirubina eliminată din fagocite în plasmă este insolubilă; ea se combină aproape instantaneu cu

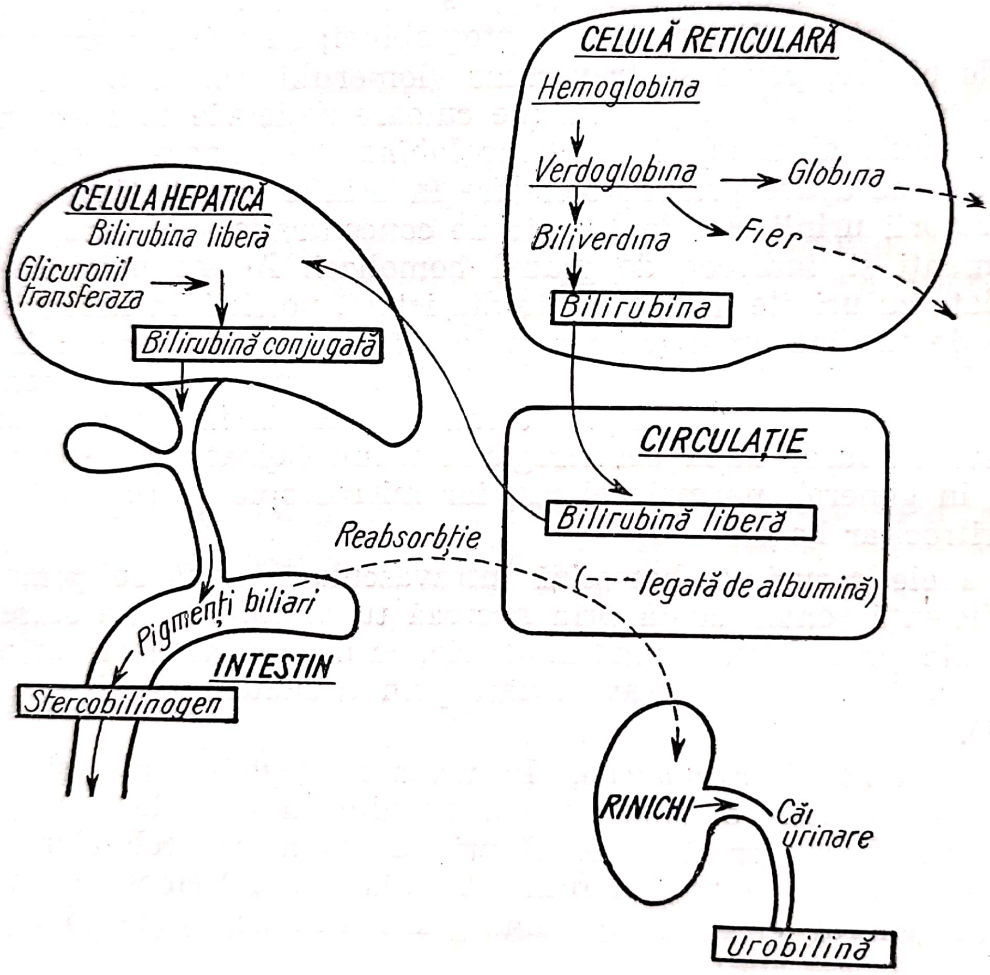


Fig. 7-30. Ciclul produșilor de degradare a hemului (modificat după J. Bernard și colab., 1971).

albumina. Combinarea bilirubinei primare cu albumina este numită, impropriu, *bilirubină liberă* (bilirubină neconjugată sau bilirubină indirectă), spre deosebire de bilirubina solubilă, metabolizată de ficat, care se numește *bilirubină conjugată* (bilirubină combinată sau bilirubină directă) (fig. 7-30).

Scanned with OKEN Scanner

În mod normal bilirubina se găsește numai în tranzit în plasma sanguină, dovadă cantitatea mică de bilirubină totală din ser (normal 0,3—1 mg%), datorită depurării hepatice foarte eficace. Această bilirubină este aproape exclusiv de tip indirect (circa 90%). Cantitatea totală de bilirubină elaborată fiziologic în 24 de ore este de circa 200 mg ceea ce corespunde, cu aproximație, cantității de hemoglobină distruse. În urma unor studii efectuate pe indivizi normali și pe bolnavi cu icter intens s-au constatat valori ale bilirubinemiei ce variau între 0,2 și 20 mg%.

Un gram de albumină fixează, cu aproximație, 16 mg de bilirubină (raport molar de 2/1); totuși, prin legături labile, albumina se poate încărca cu cantități mult mai mari de bilirubină, ajungîndu-se pînă la un raport molar de 12/1. În acumulările excesive de bilirubină (cînd se depășește concentrația de 210 mg/100 ml·ser), bilirubina necuplată cu albumina se oxidează rapid ne mai intrînd în ciclul bilirubinic. Acest produs neprotejat de albumină este incolor, hidrosolubil și nu reacționează la reacția diazo, iar electroforetic migrează cu albuminele α_1 și α_2.

c. **Metabolismul hepatic al bilirubinei și mecanismele de producere a icterelor.** Albumina plasmatică predă celulelor hepatice bilirubina circulantă indirectă. Acest transfer se realizează tot pe baza unei „competiții" interproteice. Transportul plasmatic al bilirubinei este selectiv, iar bilirubina se elimină aproape exclusiv prin ficat. Nivelul bilirubinei nu crește decît dacă este depășită capacitatea de depurare a ficatului; hiperbilirubinemia indirectă nu constituie un semn obligator de hiperhemoliză, în cazurile în care ficatul este deficient (207, 289).

Mecanismele de producere a icterelor. Apariția culorii icterice a tegumentelor și mucoaselor este dată de creșterea bilirubinei din sînge. Prezența ei în exces poate rezulta din mai multe mecanisme (fig. 7-31 și fig. 7-32).

Ictere suprahepatice (ictere de tip hemolitic); ele pot fi datorate:

— supraproducției de pigmenți biliari, de origine eritrocitară sau preeritrocitară, pe care ficatul nu-i poate metaboliza și elimina (hemoliză crescută);

— supraproducției de pigmenți biliari din alte surse decît catabolismul eritrocitar.

Ictere intrahepatice; ele pot ține de:

— o tulburare în pătrunderea bilirubinei în celulele hepatice, începînd cu nivelul capilarelor venoase sau sinusoide pînă la transportul lor activ la microsomi: *ictere premicrosomiale;*

— o tulburare a mecanismului de conjugare a bilirubinuriei în microsomii celulei hepatice: *ictere microsomiale;*

— împiedicarea excreției bilirubinei conjugate în canaliculele biliare: *ictere postmicrosomiale.*

Ictere subhepatice, datorate împiedicării excreției bilirubinei conjugate prin obliterarea canaliculelor sau a căilor biliare extrahepatice.

În grupul icterelor nehemolitice, dar cu bilirubinemie indirectă crescută, este greu de delimitat gradul în care, la constituirea icterului, este

Scanned with OKEN Scanner

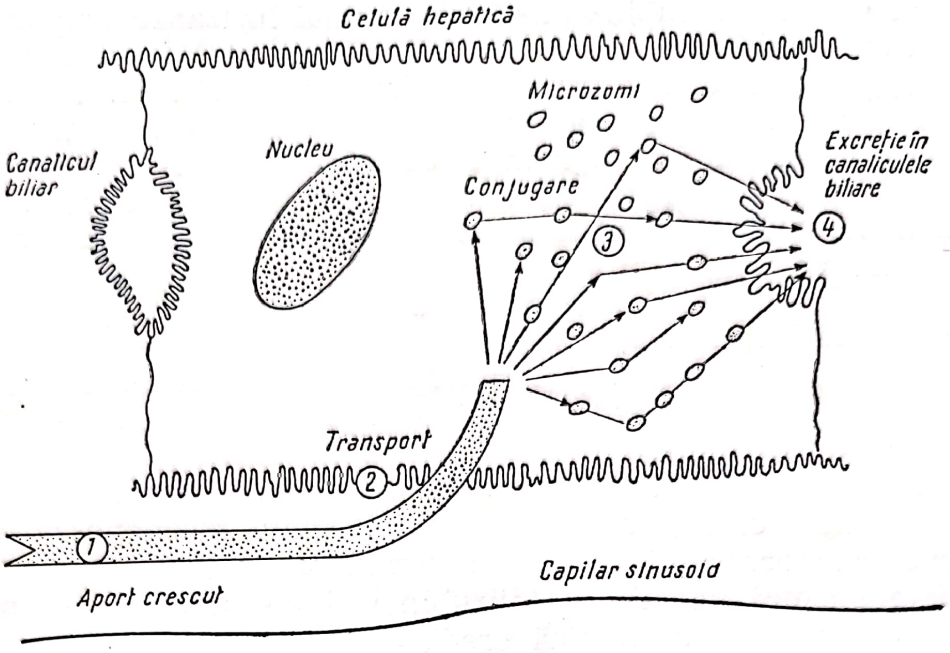


Fig. 7-31. Modalitățile de apariție a unui icter (după S. Sherlock, 1964).

Legenda: 1) aport excesiv de bilirubină; 2) deficiențe hepato-celulare de absorbție și transport; 3) tulburări ale conjugării bilirubinei de către microzomii celulei hepatice; 4) insuficiență de excreție canaliculară sau obstrucție mecanică a căilor biliare.

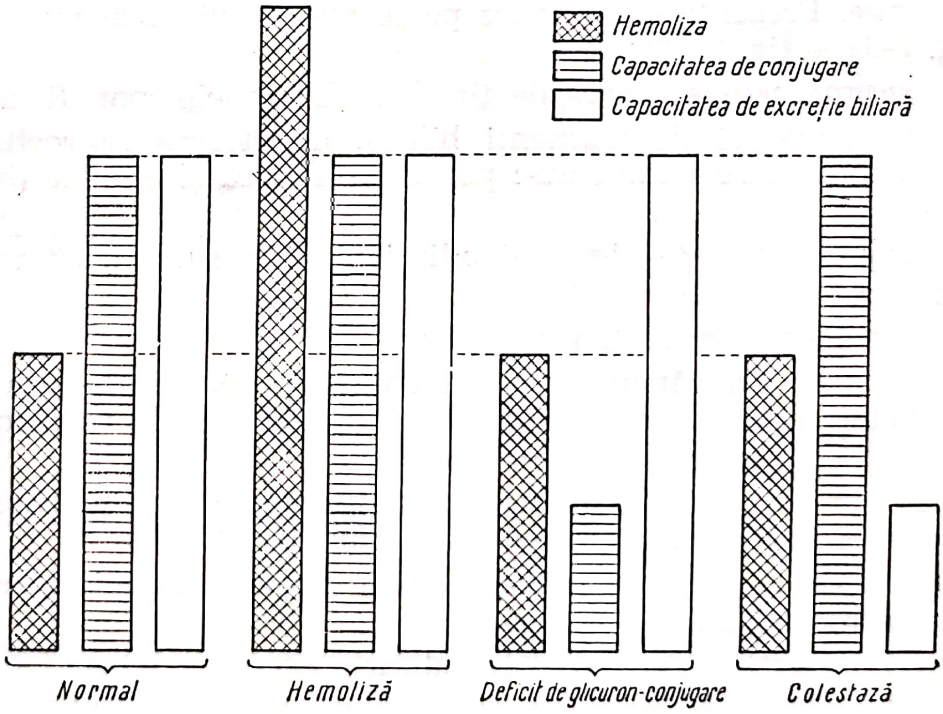


Fig. 7-32. Schema fiziopatologiei icterelor nou-născuților (după C. Herovin, 1972).

în cauză (sau predomină) defectul de *transport* al bilei neconjugate la celula hepatică, defectul de *conjugare* al bilirubinei sau cel de *eliminare* al ei, cînd nu există semne de blocare evidentă. De altfel, toate aceste afecţiuni au unele aspecte neelucidate încă, uneori fiind în cauză, concomitent, mai multe mecanisme.

1) *Icterele prehepatice* (de tip hemolitic). În condiţii fiziologice întreaga cantitate de bilirubină cuplată cu albumina ajunge în ficat. Apariţia icterului prin creşterea bilirubinei indirecte se întîlneşte în anemiile hemolitice, cînd capacitatea celulelor hepatice de a conjuga bilirubina este depăşită de oferta de bilirubină plasmatică. Acest mecanism apare şi în hematoamele mari, infarctele întinse de organe etc. Complexul format de molecula de bilirubină legată de albumină fiind prea mare, nu poate traversa filtrul renal, astfel încît, indiferent de intensitatea icterului şi de nivelul bilirubinei libere în plasmă, bilirubina nu ajunge în urină; de asemenea, urina nu conţine nici săruri biliare, icterul fiind numit, din această cauză, *icter acoluric*. Absenţa bilirubinei în urinile bolnavilor cu icter hemolitic are o mare valoare de diagnostic diferenţial. În afara cantităţii crescute a bilirubinei indirecte din ser, bolnavii mai prezintă o creştere importantă a urobilinogenului urinar. Acesta provine din bilirubina indirectă, conjugată de către celulele hepatice şi excretată apoi prin bilă în intestin, de unde se resoarbe aparte sub formă de urobilinogen. O cantitate mare de urobilinogen reabsorbit în circulaţia portală neputînd fi reţinută (şi eliminată din nou în totalitate de către ficatul suprasolicitat), o parte din el ajunge în circulaţia generală eliminîndu-se prin urină (34).

Capacitatea funcţională a ficatului în icterele hemolitice fiind bună (întrucît icterul este de natură extrahepatică), prin bilă se excretă o cantitate considerabilă de bilirubină conjugată, care (după ce suferă anumite transformări), se elimină prin scaun sub formă de urobilinogen în cantitate pînă la 1—2 g în 24 ore (normal 0,100—0,200 g). Cînd tranzitul intestinal este foarte rapid sau cînd flora microbiană este distrusă prin utilizare orală de antibiotice, nu se mai produce degradarea bilirubinei conjugate, care apare în scaun ca atare, conferindu-i o culoare iniţial galbenă ca „jumările de ou".

2) *Icterele hepatice*. În funcţie de nivelul infrastructural al afectării hepatocitului, hiperbilirubinemiile hepatocelulare ereditare se împart în trei grupe:

a) *Hiperbilirubinemii premicrosomiale* (de absorbţie sau de transport intracelular). Tulburările absorbţiei şi de transport ale bilirubinei din capilarele şi sinusurile hepatice, pînă la microsomii intracelulari, constituie un mecanism de producere a icterului care, deşi este rar întîlnit în practica clinică, are o mare importanţă teoretică. Blocajul în această tulburare se produce înainte ca bilirubina indirectă să ajungă la organitele celulare a căror funcţie este normală. În acest sindrom, în afară de leziunile endoteliului sinusal şi ale polului vascular al hepatocitelor, se constată incluzii biliare intramitocondriale sub formă de cristale şi filamente, ceea ce permite o analogie şi cu depozitele de fier mitocondrial

Scanned with OKEN Scanner

din anemiile sideroacrestice. Pînă în prezent nu a fost identificată nici o enzimă răspunzătoare de această acumulare. Acest tip de icter este lipsit de prurit (din cauză că sărurile biliare nu sînt crescute în sînge); bilirubina este de tip indirect, stercobilinogenul fecal este în limite normale; hematologic, semnele de hemoliză lipsesc, iar medulograma este normală.

O entitate individualizată a acestui tip de hiperbilirubinemie o formează *sindromul Gilbert* (1901), cunoscut și sub denumirile de disfuncție constituțională sau colemie familială nehemolitică.

b) *Hiberbilirubinemiile microsomiale* (prin deficit de conjugare). Pentru a putea fi excretată, bilirubina neconjugată (liposolubilă) necesită, în prealabil, conjugarea; numai sub această formă ea devine hidrosolubilă. Acidul glucuronic este principalul agent de conjugare al bilirubinei (peste 80%).

Modul de activare al acestuia este fixarea pe grupul carboxilic a fiecăruia din cei doi radicali propionici, realizînd (cel mai frecvent), un diglucuronid bilirubinic. Acidul glucuronic nu se găsește ca atare în microsomii hepatocitului, ci este legat de produsul acid uridil-difosfo-glucuronic (UDPGA). Transferul acidului glucuronic și legarea lui de bilirubină se face prin reacție enzimatică sub dependența enzimei microsomale — *glucuronil-transferaza* (fig. 7-33).

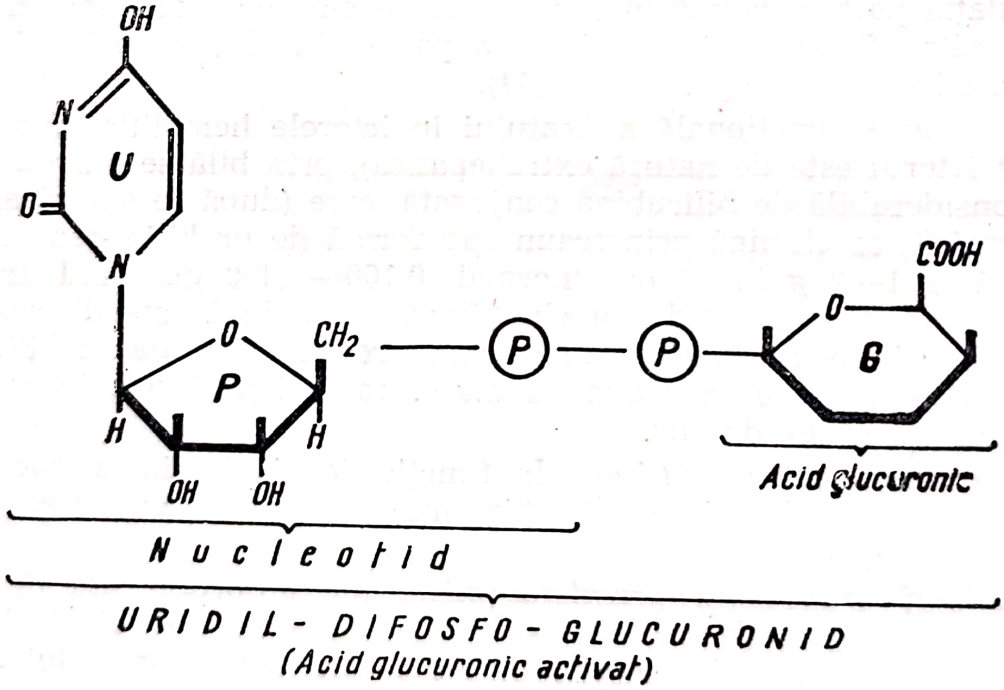


Fig. 7-33. Formula desfășurată a acidului uridil-difosfat-glucuronic. Conjugarea acidului glucuronic (o moleculă de glucoză (G) purtînd gruparea —COOH), cu bilirubina liberă este precedată de sinteza substratului donator de acid glucuronic (un nucleotid difosfat). Acidul glucuronic astfel „activat", prin intermediul unei enzime de conjugare (uridil-difosfat-glucuronat-transferaza), se leagă (cîte o moleculă) de fiecare din cele două grupări —COOH ale acidului propionic (radical lateral al lanțului tetrapirolic al bilirubinei), eliberîndu-se de gruparea uridil-difosfat (vezi și fig. 7-34). Nucleotidul activator variază după tipul bazei azotate (în figura noastră uracil). Legenda: U=uracil; P=pentoză; G=glucoză; P =acid fosforic.

Scăderea capacității de conjugare enzimatică a bilirubinei în microzomii din hepatocite duce la apariția unor tipuri speciale de icter la copii. Forma cea mai ușoară se întîlnește în *icterul fiziologic al prematurilor și al nou-născuților*. Ficatul acestora nefiind în stare de maturitate funcțională, este incapabil să transforme întreaga cantitate de bilirubină indirectă care i se prezintă, fără să existe însă semne de hemoliză. Cînd nivelul crescut al bilirubinei indirecte din ser se menține timp mai îndelungat (așa cum se întîmplă chiar și în boala hemolitică a nou-născutului), pot să apară fenomene toxice la nivelul creierului cu instalarea icterului nuclear (Kernicterus). Durata scurtă și intensitatea redusă a icterului neonatal fiziologic se explică prin maturizarea rapidă a enzimelor de glucurono-conjugare (glucuronil-transferaza) (fig. 7-34).

Boala descrisă de Crigler și Najjar în 1952 este o afecțiune familială foarte rară, care, de asemenea, se manifestă imediat după naștere. În această afecțiune icterul este intens, iar bilirubina indirectă este mult mai crescută, fără să existe semne de hemoliză. Boala se manifestă printr-un sindrom neurologic sever (opistotonus, spasticitate, ataxie etc.) și se termină adesea cu exitus; s-au descris și forme cu manifestări tardive.

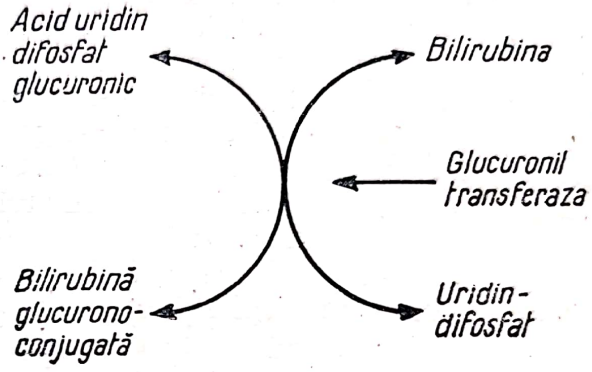


Fig. 7-34. Conjugarea în ficat a bilirubinei cu acidul uridildifosfoglucuronic (după S. Sherlock, 1964).

În ficat bilirubina insolubilă este conjugată, enzimatic, de către glucuronil-transferază, sub formă de mono- sau diglucuronide.

c) *Incapacitatea excreției bilirubinei conjugate din hepatocite* (fără obstrucția căilor biliare). Mecanismul de producere a acestei tulburări nu este încă complet elucidat. Stagnarea intrahepatică a bilei prin alte mecanisme decît prin obstrucția căilor biliare extrahepatice este cunoscută sub termenul de *colestază*.

Forme individualizate de icter hepato-celular postmicrosomial, prin tulburare a excreției bilirubinei conjugate, sînt cunoscute prin sindroamele Dubin-Johnson și Rotor.

Sindromul Dubin-Johnson (1954) constă dintr-un defect de excreție a bilirubinei conjugate. Clinic se traduce printr-un icter familial ce debutează în copilărie dar cu stare generală bună în tot cursul bolii. În urină pigmenții biliari sînt crescuți, iar scaunele sînt decolorate. La laparoscopie se constată un ficat mare de culoare verde-maronie sau chiar neagră, iar la examenul histologic o cantitate crescută de pigment în celulele hepatice. Puncția biopsie hepatică pune în evidență prezența pigmentului brun sub formă de granulații mari la nivelul hepatocitelor, predominant în regiunea centrolobulară, dar și în celulele Kupffer. Acest pigment unii îl consideră lipofuscină, alții melanină. Evoluția bolii este cronică, iar prognosticul este bun; asociația cu litiaza veziculară este frecventă.

Sindromul Rotor (1948) are un cadru clinic asemănător dar histologic nu prezintă depozitări pigmentare hepatice vizibile la microscopul optic.

Marea majoritate a icterelor hepatice sînt însă cîștigate; în aceste cazuri este alterat hepatocitul a cărui funcție metabolică devine insuficientă (de exemplu hepatită epidemică etc.). În aceste cazuri excreția bilirubinei conjugate din hepatocite este împiedicată, deși

Scanned with OKEN Scanner

canaliculele biliare rămîn permeabile, de aceea, alături de urobilinogenul urinar, se va găsi (atît în ser, cît și în urină) și bilirubină conjugată.

3) *Icterele posthepatice* Hiperbilirubinemia în aceste afecțiuni este provocată de tulburări de drenaj intra- sau extrahepatic. Obstrucția căilor biliare extrahepatice poate surveni în cazuri de litiază, prin procese neoplazice sau inflamatorii, stenoze, pătrunderea în căile biliare a unor paraziți, compresiuni prin tumori de cap de pancreas etc.

În aceste tulburări de drenaj are loc o inversare a transportului bilei, cu regurgitare transcelulară. Clinic ele se traduc prin icter intens, de obicei de nuanță verzuie, însoțit de prurit, cu sau fără dureri, eventual cu febră. Biochimic, bilirubina serică este de tip conjugat, însoțită de creșterea sărurilor biliare și a colesterolului; se constată, de asemenea, o activitate crescută a fosfatazei alcaline serice. Scaunele sînt acolice, iar în urină se elimină cantități crescute de bilirubină conjugată; această bilă fiind hidrosolubilă poate trece prin filtrul renal apărînd în urină ca atare (spre deosebire de urina din icterele hemolitice). În icterele prin obstrucție mecanică, bilirubina fiind scăzută sau absentă în intestin, reabsorbția ei sub formă de urobilinogen este corespunzător scăzută, astfel încît nici urinile nu conțin urobilinogen (tabelul 7-1).

Tabelul 7-1

	Sînge		Urină	
	bilirubină directă	bilirubină indirectă	pigmenți biliari	urobilinogen
Icter mecanic	++	–	+++	–
Icter hepatocelular	+++	+	+++	+++
Icter hemolitic	–	+++	–	+++

În practică nu apare însă în mod riguros această situație, rezultatele biologice fiind în mare măsură legate de forma clinică, evoluție, gravitate, complicații etc.

d. **Circuitul enterohepatic al bilirubinei.** În cadrul circuitului enterohepatic, o parte din produșii de degradare ai bilirubinei pot fi reabsorbiți prin peretele intestinal ajungînd, pe calea circulației porte, din nou în ficat, de unde iarăși sînt excretați prin bilă în intestin. O parte și mai mică (1% din cantitatea eliminată prin materiile fecale) poate să iasă din circulația portă ajungînd în circulația generală. Acești produși, fiind hidrosolubili se elimină prin urină sub formă de urobilinogen (fig. 7-35). Cantitatea zilnică eliminată pe această cale se ridică în mod normal la 0,5—2 mg/24 de ore (210).

Scanned with OKEN Scanner

Creșterea urobilinogenului urinar (element foarte important pentru diagnostic) are loc în următoarele situații:

— în caz de *insuficiență hepatică*, cînd, din cauza leziunilor parenchimatoase, ficatul nu poate intercepta și elimina întreaga cantitate de urobilinogen transportată pe calea portă; în plus, în cazul cirozelor, o cantitate de urobilinogen ajunge direct în circulația generală, pe calea anastomozelor porto-cave, ocolind ficatul;

— în cazul unui *aport crescut de pigmenți biliari* în intestin (în icterele hemolitice), aceștia fiind resorbiți în cantitate mare (sub formă de urobilinogen), depășesc capacitatea de excreție de către ficatul suprasolicitat cu conjugarea bilirubinei indirecte provenite din plasma sanguină și ajung astfel în circulația generală în cantitate crescută.

e. **Metabolismul intestinal al bilirubinei.** Bilirubina conjugată, excretată în intestin, suferă în colon o serie de reduceri prin acțiunea bacteriilor (îndeosebi a bacilului coli). Această transformare poate să se producă, în anumite stări patologice, chiar în intestinul subțire sau în căile de excreție biliară, în funcție de popularea bacteriană a acestor segmente. Bilirubina conjugată este astfel transformată în *cromogeni (incolori)* care formează *grupa urobilinogenilor*. Cei mai importanți urobilinogeni sînt *d-urobilinogenul, mezobilirubinogenul* și *stercobilinogenul*. Cu reactivul aldehidic al lui Ehrlich ei dau o colorație roșie-vișinie, a cărei intensitate este proporțională cu cantitatea de urobilinogen.

Tot sub influența florei microbiene, o parte din acești urobilinogeni se oxidează trans-

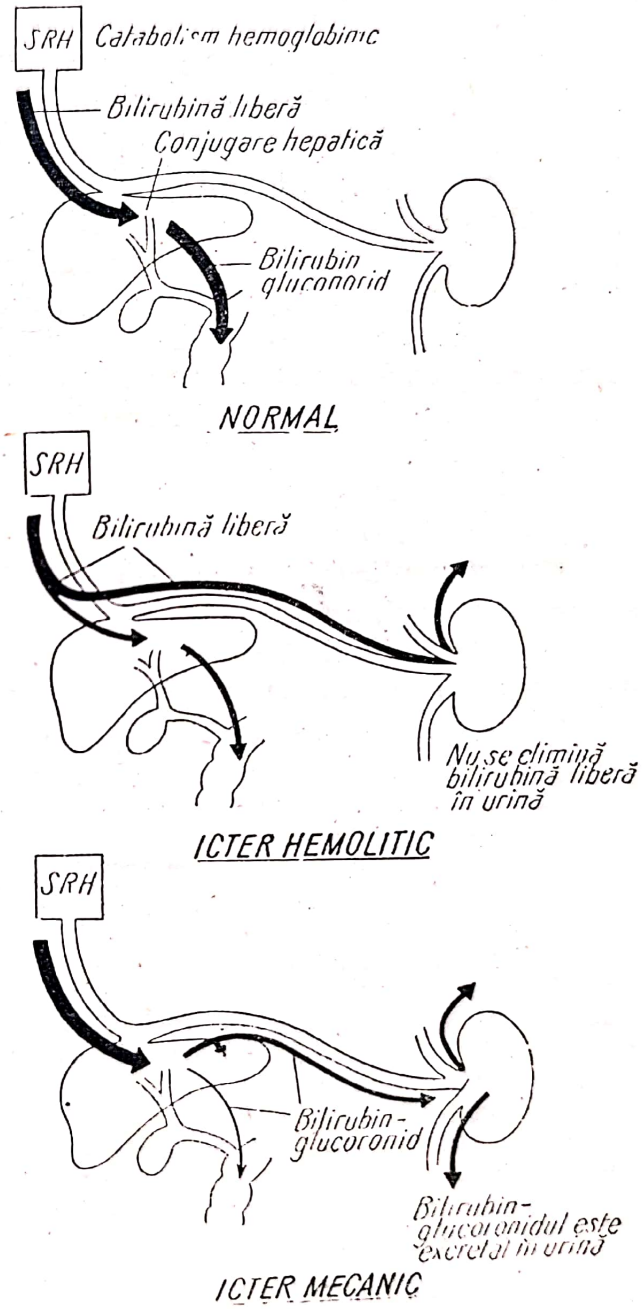


Fig. 7-35. Schemă înfățișînd circuitul bilirubinei directe și indirecte, în condiții normale, în icterul hemolitic și în icterul mecanic.

formîndu-se în urobilină (d-urobilină, urobilină IX și stercobilirubină) care sînt pigmenți de culoare galben-portocalie ce dau, cu acetatul de zinc în alcool, o fluorescență verde (soluția Schlesinger). Această oxidare se produce și spontan prin contactul scaunelor cu aerul.

În mod normal, se elimină zilnic prin intestin o cantitate de 50—300 mg de astfel de produși, nivel ce corespunde aproximativ cu distrugerea celor 5—8 g de hemoglobină. (Un gram de hemoglobină dă naștere, prin degradare, la circa 55 mg de bilirubină ceea ce corespunde cu o producție zilnică de circa 250 mg.) Numai o mică parte din stercobilinogen se absoarbe prin peretele intestinal.

Raportul dintre diverșii produși intestinali ai bilirubinei degradate este foarte variabil, depinzînd de mobilitatea conținutului intestinal, de viteza de umplere a colonului, de calitatea și cantitatea florei intestinale și de absorbția intestinală a acestora. În primele săptămîni de viață a nou-născutului bilirubina nu suferă reducerile amintite la individul adult din cauză că intestinul acestuia nu s-a populat cu flora microbiană. Din această cauză culoarea scaunelor expuse la aer devine verzuie, prin transformarea bilirubinei în biliverdină. Același lucru se constată și la indivizii care au urmat, pe cale orală, un tratament antibiotic cu spectru larg, precum și la persoanele sau animalele de experiență ținute în condiții de sterilitate totală *(germ-free)*.

Hiperhemoliza se caracterizează prin următoarele semne de laborator: creșterea bilirubinei libere în ser, creșterea stercobilinogenului fecal, creșterea reabsorbției intestinale a stercobilinogenului (care se poate însoți de o eliminare renală crescută de urobilinogen) și de absența bilirubinuriei.

Cantitatea de *stercobilinogen fecal* trebuie interpretată în funcție de cantitatea totală de hemoglobină circulantă; aceste valori intră în calculul „indicelui hemolitic" (IH) cu următoarea formulă:

$$IH = \frac{\text{Stercobilinogen fecal (în mg)} \times 100}{\text{Hb totală circulantă (în g)}} = \text{normal sub } 14$$

Indicele hemolitic permite o evaluare mai exactă a intensității hemolizei decît cifra de stercobilinogen singură, de exemplu, dacă distrucția eritrocitară se dublează față de valorile fiziologice, iar hemoliza este compensată de către măduvă, stercobilinogenul fecal se va dubla. Dacă însă un proces hemolitic de aceeași intensitate provoacă o anemie de circa 2 500 000 de eritrocite pe mm^3, (hemoliză necompensată), cantitatea de stercobilinogen fecal va fi normală (aparent). Avînd în vedere însă că ea provine dintr-un fond de hemoglobină totală, egal cu 1/2 din valoarea normală (ceea ce este exprimat la numitorul indicelui de hemoliză), înseamnă că ritmul disjuncției eritrocitare este dublu față de normal.

Metode de diferențiere calitativă a pigmenților biliari.

Metoda diazo. Prima reacție care a permis diferențierea tipurilor de ictere după criterii biochimice a fost făcută în anii 1913 și 1916 de către Hymans Van den Bergh, care a amestecat serul acestor bolnavi cu diazo-reactivul lui Erlich (ce conține acid diazo-benzen-sulfonic). De la primele observații ale lui Hymans Van den Bergh care deosebea două tipuri de bilirubină (directă și indirectă), metodele de dozare s-au înmulțit.

Scanned with OKEN Scanner

Apariţia imediată a unei culori violete caracteristice traduce prezenţa bilirubinei directe; dacă această culoare apare numai după adăugarea unui „accelerator" (alcool metilic, benzoat de cofeină etc.), ea arată prezenţa bilirubinei neconjugate care este solubilizată de aceste substanţe. În practică, citirea se face după un minut de la producerea amestecului şi la 15 minute după adausul de alcool. Această tehnică este utilizată în toate laboratoarele, dar are o valoare de orientare.

Metode cromatografice. În 1954, Cole, Lathe şi Billing au folosit metoda cromatografiei, izolînd un număr de derivaţi prin mai multe filtre. Derivatul B din primul filtru a fost diferenţiat prin utilizarea altui solvent. Aceşti produşi nu corespund cu pigmenţii separaţi prin metoda diazo.

f. **Surse extraeritrocitare de pigmenţi biliari.** Mult timp s-a considerat că pigmenţii biliari iau naştere exclusiv din catabolismul hemoglobinei. Cercetările experimentale, bazate mai ales pe urmărirea produşilor de metabolism intermediar cu ajutorul izotopilor radioactivi, au adus unele date noi. În stare normală există un decalaj sensibil între cantitatea de pigmenţi biliari excretată şi cantitatea de Hb catabolizată, calculată pe baza determinării duratei de viaţă a eritrocitelor. Din hemoglobina marcată cu ^{14}C, doar 40—45% a putut fi regăsită sub formă de pigmenţi biliari, de unde reiese că o parte din hem se transformă în alţi produşi

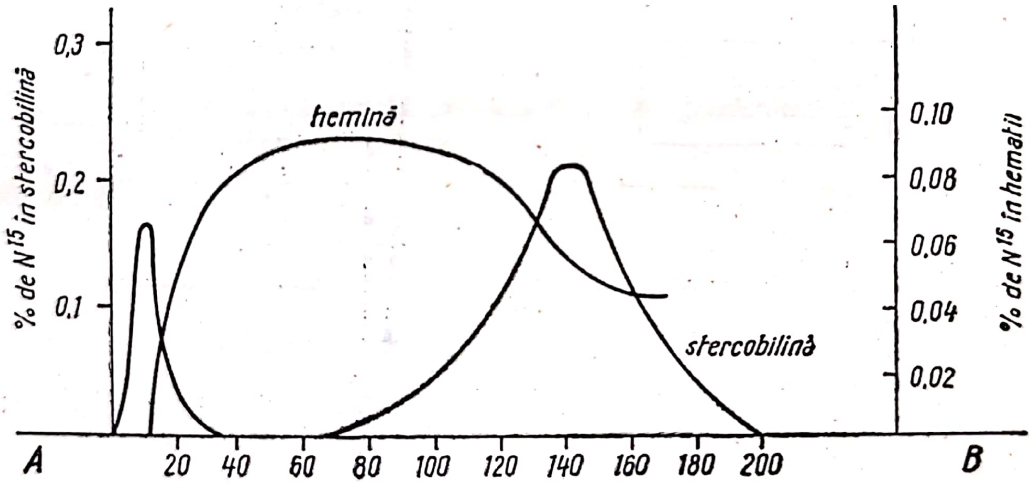


Fig. 7-36. Reprezentarea schematică a rezultatelor studiului încorporării glicinei ^{15}N în hem (după Gray, Neuberger şi Sneath).

S-a urmărit apariţia ei în sînge sub formă de hemină şi în scaun (stercobilină), în funcţie de timp. Curba stercobilinei prezintă 2 vîrfuri: primul apare precoce (la 3—10 zile după administrarea glicocolului marcat), iar al doilea apare tîrziu, atingînd nivelul maxim la sfîrşitul duratei de viaţă eritrocitară (circa 120 de zile).

intermediari decît pigmenţii biliari. Pe de altă parte pigmenţii biliari pot fi produşi şi prin alte surse decît din produşii de degradare eritrocitară. London şi colab. administrînd glicocol marcat cu azot, au constatat că se obţin două curbe de radioactivitate în stercobilina fecală, una tardivă, care atinge valoarea maximă după 120 de zile de la administrare, şi alta precoce, după circa 6 zile de la administrare (fig. 7-36).

Scanned with OKEN Scanner

Originea acestei stercobiline precoce a fost atribuită:

— surselor de hem nehemoglobinic: mioglobină, catalază, peroxidază, citocromi (hem neeritrocitar neeritropoietic);

— distrugerii intramedulare precoce de eritroblaşti (hem neeritrocitar, dar eritropoietic), ceea ce se constată şi în condiţii fiziologice, într-o proporţie redusă;

— hemoglobinei libere ajunse în plasmă o dată cu expulzia nucleilor eritroblaştilor oxifili (fier neeritrocitar dar eritropoietic), obişnuită în condiţii fiziologice (vezi şi fig. 2-11).

În condiţii normale bilirubina provenită din hemul neeritrocitar reprezintă 10—15% (eritropoieză ineficientă); ea rezultă din depăşirea eritropoiezei fiziologice. Patologic ea poate atinge şi valori de 60—80%, însoţite de măduvă hiperplazică, fără semne de hiperhemoliză, de exemplu în cazurile în care precursorii eritrocitari se distrug prematur în măduva hema-

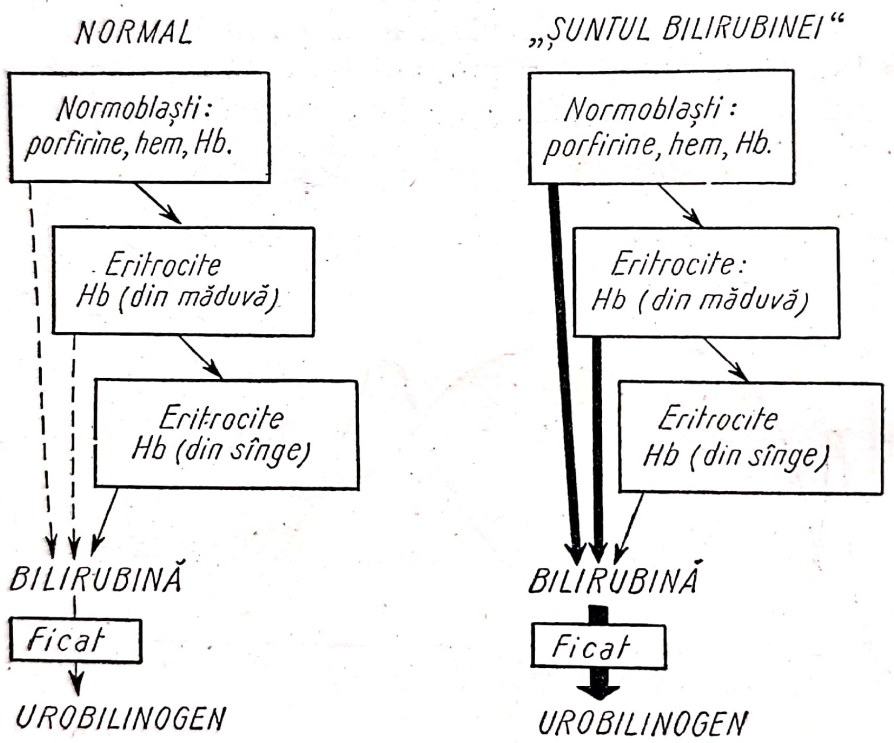


Fig. 7-37. Originea „şuntului bilirubinei" (după L. C. Israels şi colab., 1959).

Israels şi colab. au descris un sindrom de hiperbilirubinemie în care bilirubina derivă din normoblaşti sau din eritrocitele care nu au părăsit încă măduva, pe care l-au numit „şuntul bilirubinei" (210).

toformatoare hiperplaziată (eritroblaşti şi chiar neeritroblaşti sau reticulocite) de exemplu anemiile sideroacrestice, talasemia, anemia Biermer, eritromieloză etc. Pe de altă parte s-a constatat că pigmenţii biliari se pot forma şi direct din precursori simpli (glicocol, acid δ-amino-levulinic).

Curba tardivă reprezintă, în cea mai mare parte, stercobilina provenită din distrucţia eritrocitară. Ea corespunde mai exact cu excreţia pro-

dușilor de degradare a bilirubinei în materiile fecale. Aceste constatări au dus la înțelegerea unor observații clinice care pînă atunci nu și-au găsit o explicație valabilă.

Israels și colab. (1959), au descris o boală familială care se încadrează în patogenia arătată mai sus, pe care au numit-o *hiperbilirubinemie esențială prin șunt.* Sub acest termen autorii au vrut să arate că există o sursă de pigmenți biliari în afara eritrocitelor* (fig. 7-37). Cazurile descrise se caracterizează prin hiperbilirubinemie, fără fenomene hemolitice și fără afectare hepatică, dar cu excreție importantă de urobilină fecală (cca 1 g/24 de ore), apariția de stercobilinogen precoce în condiții crescute și scurtare a duratei de viață a eritrocitelor. Boala se normalizează după splenectomie.

În 1964, Watson și colab. au descris afecțiunea pe care au denumit-o *icter diseritropoietic idiopatic* care se caracterizează printr-o supraproducție de pigmenți biliari, în afara unei hemolize evidente; ea se datorește tulburării endomitozei, cu formare de eritroblești multinucleați (vezi și pag. 92 și 109).

Se presupune că aceste constatări vor duce la descrierea unor noi entități morbide și la înțelegerea unor mecanisme fiziopatologice.

În afara catabolismului hemoglobinei pînă la stadiul de tetrapiroli lineari, urmat de eliminarea lor prin materii fecale și urină sau de resorbția lor în circulația portală (sau generală), a fost pus în evidență un alt mecanism de catabolizare al pigmenților biliari și anume, continuarea degradării lanțului tetrapirolic cu apariția unor lanțuri mai mici, dipirolice; astfel de *compuși dipirolici* întîlniți în produșii de excreție sînt *mezobilifuscina* și *pentdiopenul*** (fig. 7-38). Dacă se admite formarea pigmenților biliari veritabili în afara catabolismului hemoglobinic, cu atît mai mult este plauzibilă prezența acestor produși prin sinteză directă.

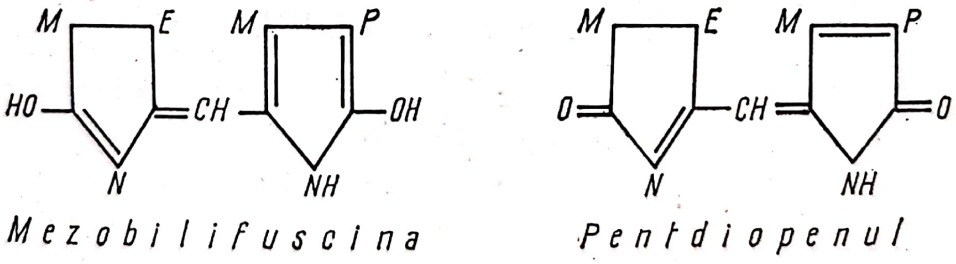


Fig. 7-38. Pigmenți biliari dipirolici: mezobilifuscina și pentdiopenul.

Acești pigmenți biliari, rezultați din degradarea, în continuare, a lanțului tetrapirolic, pot apare în urină în afara pigmentului bilirubinic. Ei provin, probabil, nu numai din degradarea hemoglobinei, ci și din sinteze directe.

---

* Ulterior, alți autori au apreciat că termenul de șunt ar putea produce unele confuzii, întrucît prin șunt s-ar putea înțelege producția pigmenților biliari exclusiv din precursorii hemului.

** Denumirea lor provine de la cuv. gr.: *mezo*=pe jumătate (pentru mezobilifuscină) și *penta* = cinci (pentaciclu pirolic) și *di* = de două ori (cîte un pirol), pentru pentdiopen.

Scanned with OKEN Scanner

II. METODE DE EVALUARE A DISTRUCŢIEI ERITROCITARE

A. TESTE DE EVALUARE A HIPERREGENERĂRII SANGUINE

1. TESTE DE EVALUARE A HIPERREGENERĂRII LA NIVELUL MĂDUVEI

În procesele hemolitice cu efort medular de compensare a pierderilor eritrocitare, puncţia medulară arată o celularitate bogată, numărul de eritroblaşti depăşind proporţia de circa 30%, iar raportul granulocite-eritroblaşti poate chiar să se inverseze (1 : 4). Morfologic, eritroblaştii sînt normoblaşti, însă în cazurile de hemoliză de lungă durată pot apărea şi macroblaşti. Trebuie amintite aici şi crizele de eritroblastopenie ce se instalează frecvent în cursul anemiilor hemolitice cronice, mai ales de tip intraeritrocitar.

2. TESTE DE EVALUARE A HIPERREGENERĂRII LA NIVELUL SÎNGELUI PERIFERIC

a. **Reticulocitoza** (vezi pag. 204).

b. **Eritroblastoza periferică** este adeseori prezentă, iar în unele cazuri, ca de exemplu în talasemia homozigotă, poate depăşi proporţia leucocitelor.

3. TESTE DE FEROKINETICĂ

Studiul măduvei osoase cu fier radioactiv arată o dispariţie rapidă a fierului din plasmă şi o încorporare eritrocitară rapidă. Dacă hemoliza este foarte intensă (precoce), se constată un nivel coborît a curbei de încorporare a fierului, înainte ca această încorporare să fi atins nivelul maxim (75) (vezi şi pag. 356).

B. TESTE DE EVALUARE A DISTRUCŢIEI ERITROCITARE

1. TESTE DE EVALUARE A DISTRUCŢIEI ERITROCITARE „INTRAVASCULARE"

a. **Hemoglobinemia plasmatică** (vezi pag. 409)

b. **Testul de haptoglobinemie** (vezi pag. 410)

c. **Hemoglobinuria şi hemosideremia** (vezi pag. 411)

Scanned with OKEN Scanner

2. TESTE DE EVALUARE A DISTRUCȚIEI ERITROCITARE „INTRACELULARE"

a. **La nivelul sîngelui circulant** (vezi hiperbilirubinemia indirectă, pag. 415).

b. **La nivelul fecalelor** (vezi stercobilinogenul fecal, pag. 419).

c. **La nivelul urinii** (vezi urobilinuria, pag. 414).

3. TESTE DE EVALUARE A REZISTENȚEI ERITROCITARE

Explorarea capacității eritrocitelor de a rezista la diferiții agenți fizici, chimici și biologici cuprinde o varietate largă de metode. Hemoliza poate fi provocată experimental prin mai multe *procedee fizice* ca: expunerea eritrocitelor în soluții hipotone, agitarea mecanică a sîngelui, conservarea sîngelui la termostat, expunerea sîngelui la lumina solară, la raze ultraviolete, la raze Roentgen etc., modificări bruște de temperatură (îngheț, dezgheț) și altele. De asemenea, rezistența eritrocitelor a fost încercată prin numeroase *sensibilizări chimice,* ca incubarea lor în soluții acide, în prezența unor factori ai coagulării etc.

a. **Rezistența osmotică a eritrocitelor.** Între mediul intra- și cel extraeritrocitar nu există practic diferențe de concentrație osmotică. În timp ce apa trece liberă dintr-un sector în altul, intrarea și ieșirea sărurilor minerale și a altor substanțe este controlată de către membrană prin mecanisme active cu consum important de energie. Cînd concentrația de săruri din exterior este mai mare decît cea din interior (soluție hipertonă), apa din eritrocit este atrasă în afară, iar eritrocitul se zbîrcește. Cînd concentrația mediului exterior este mai mică decît în eritrocit (soluție hipotonă), apa pătrunde în interiorul lui ducînd la umflare, care, dacă depășește o anumită limită, duce la plesnirea lui cu eliberarea de hemoglobină în mediul extern (87, 188), (fig. 7-39).

Grăbirea artificială a hemolizei poate fi apreciată mai bine prin expunerea eritrocitelor la condiții din ce în ce mai nefavorabile și aprecierea cantității de hemoglobină eliberată. Metoda constă în introducerea eritrocitelor în soluții descrescînde de NaCl, începînd de la concentrația izotonică (9‰) pînă la concentrații apropiate de zero (apă distilată), urmărindu-se concentrația la care începe hemoliza și aceea la care hemoliza este totală. O apreciere cantitativă mai exactă a mersului hemolizei este posibilă prin determinarea cantității de hemoglobină eliberată. În mod normal se începe la 4,6‰ și se termină la 3,6‰.

În tabelele 7-2 și 7-3 este redată tehnica acestei probe.

Distribuirea H_2O și a NaCl se face cu aceeași pipetă, ținută la aceeași înclinație. Se agită suspensia care se ține 20 de minute la 37° sau 2 ore pe masa de laborator. Sîngele se poate introduce direct din seringa cu care a fost extras din venă sau se poate recolta pe oxalat de Na 1/10 M în proporție de 9/1.

Explicația faptului că nu toate eritrocitele rezistă la aceeași concentrație de ClNa, nici măcar în condiții fiziologice, constă în diferența lor de vîrstă; cele tinere fiind mai rezistente, se distrug la limita inferioară a hipotoniei, iar cele mai bătrîne, către limita superioară. În afară de procesul de uzură, prin îmbătrînire, eritrocitele pot deveni mai fragile, în urma acțiunii anumitor factori intra-

Scanned with OKEN Scanner

sau extraeritrocitari. Rezistența osmotică este cu atît mai scăzută, cu cît sfericitatea eritrocitelor este mai pronunțată în momentul introducerii lor în soluțiile hipotone (de exemplu, în sferocitoza ereditară); din același motiv ea este crescută în situațiile în care există o „platicitoză" (de exemplu în talasemie) (fig. 7-40).

b. **Rezistența mecanică.** În unele anemii hemolitice cu rezistență osmotică crescută (talasemie și altele), se constată o rezistență scăzută la

Tabelul 7-2

Tehnica clasică a determinării rezistenței osmotice în 18 tuburi de hemoliză (concentrația NaCl scade cu 0,2‰ de la un tub la altul)

Concentrația NaCl ‰	6	5,8	5,6	5,4	... ...	3	2,8	2,6
Nr. picături de apă distilată	5	6	7	8	... ...	20	21	22
Nr. picături de ClNa ‰	30	29	28	27	... ...	15	14	13
Nr. picături de sînge	1	1	1	1	... ...	1	1	1

Tabelul 7-3

Tehnica simplificată a determinării rezistenței osmotice în 18 tuburi de hemoliză (concentrația NaCl diminuă cu 0,5‰ de la un tub la altul)

Concentrația de NaCl ‰	9	8,5	8	... ...	2	1,5	1	0,5
Nr. picături de apă distilată	0	1	2	... ...	14	15	16	17
Nr. picături de NaCl 9‰	18	17	16	... ...	4	3	2	1
Nr. picături de sînge	1	1	1	... ...	1	1	1	1

anumite traume mecanice. Întrucît în circulație eritrocitele suferă, chiar în condiții fiziologice, anumite traume legate de însuși procesul de transport, ca lovirea de pereții vaselor, oprirea bruscă a circulației în cursul închiderii valvelor, formarea de vîrtejuri, deformarea eritrocitelor în cursul trecerii prin capilare înguste etc., s-a căutat, prin diferite procedee fizice, să se reproducă aceste traume la proporții mai mari.

Scanned with OKEN Scanner

Există diferite metode de provocare a hemolizei mecanice (282, 325); una din acestea constă în recoltarea sîngelui pe anticoagulant, ajustarea lui la hematocrit de 35% și introducerea unei cantități de 0,5 ml, într-un vas Erlenmeyer de 50 cm³ ce conține 10 bile cu diametrul de 4 mm; acest recipient se introduce într-un aparat care asigură agitarea mecanică a conținutului în condiții standard (de vîrstă și timp) după care sîngele se centrifughează și se dozează conținutul în

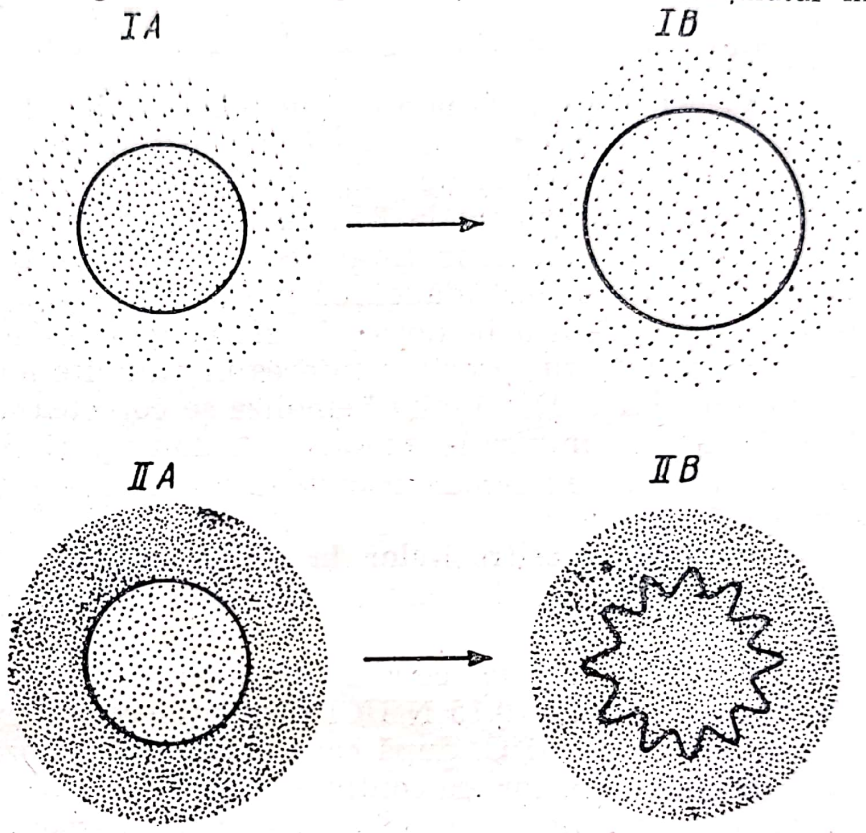


Fig. 7-39. Reprezentarea figurativă a consecințelor biofizice eritrocitare în funcție de concentrația mediului de suspensie (echilibru de membrană).

IA→IB: în mediu hipoton eritrocitul devine sferocit din cauza penetrării unui exces de apă din exterior (stare prehemolitică).

IIA←IIB: în mediu hiperton eritrocitul devine echinocit, din cauza exodului de apă din interior, membrana devenind prea „abundentă" pentru conținut (crenelare).

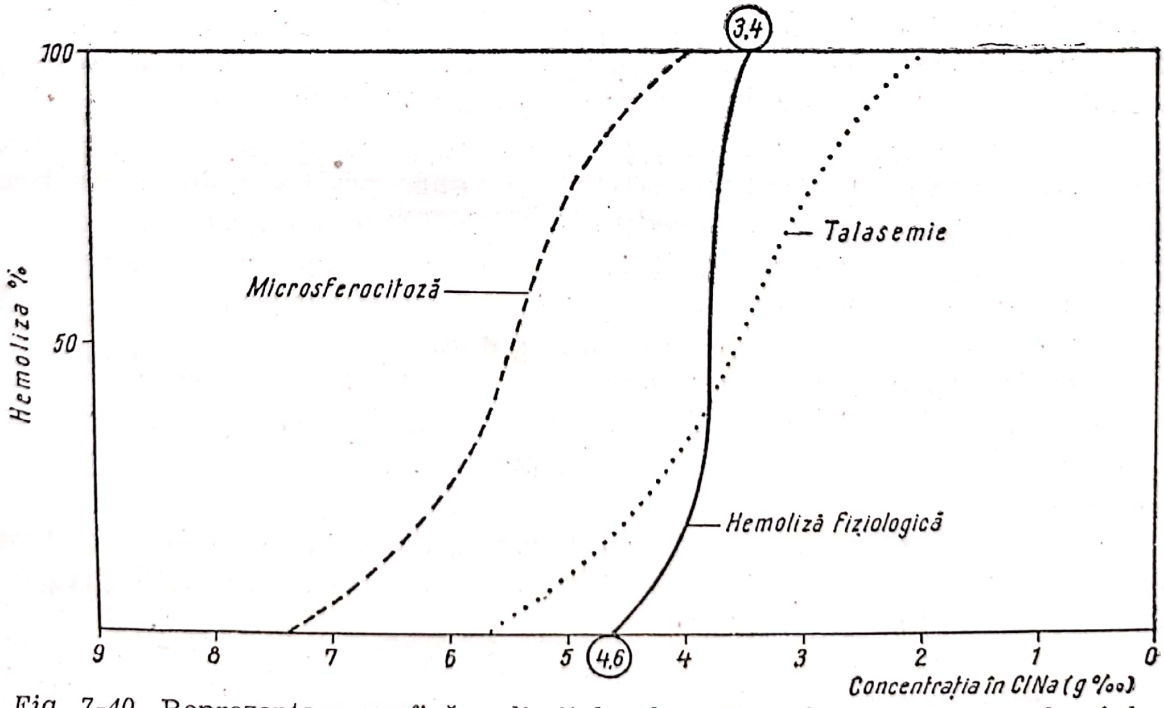


Fig. 7-40. Reprezentare grafică a limitelor hemolizei în cazuri normale și la bolnavi cu microsferocitoză ereditară și talasemie.

Scanned with OKEN Scanner

hemoglobină a supernatantului. Procentul de hemoliză se calculează după formula

$$\frac{V-P}{H-P} \times 100$$

în care V=cantitatea de Hb din plasmă după probă, P=cantitatea de Hb din plasmă înainte de probă, iar H=cantitatea totală de Hb din proba de sînge. În mod normal (cu această tehnică) hemoliza trebuie să fie sub 15%.

c. **Rezistenţa spontană a eritrocitelor in vitro la 37°**

Testul de autohemoliză după Selvyn şi Dacie constă în recoltarea sterilă de sînge heparinat şi ţinerea lui timp de 3 zile (72 de ore), la termostat la 37°. Eritrocitele normale nu sînt distruse în cursul acestei incubaţii, în timp ce în sferocitoza ereditară apare un anumit grad de hemoliză. Adăugarea prealabilă la sînge a unei mici cantităţi de glucoză, împiedică hemoliza în sferocitoza ereditară. În afara sferocitozei ereditare testul prezintă interes în anumite anemii hemolitice ereditare nesferocitare. După cum hemoliza se corectează sau nu prin adaus de glucoză, ele sînt împărţite de Dacie în dou tipuri: I şi II. Pentru ca acest test să aibă valoare reală; trebuie să se ia cele mai minuţioase precauţii de asepsie.

d. **Rezistenţa eritrocitelor la soluţii acide.** Determinarea rezistenţei eritrocitare după acidifierea mediului lor de suspensie cunoaşte mai multe variante.

1) *Testul Ham* constă în acidifierea serului sanguin propriu proaspăt cu o soluţie 0,15 N HCl şi menţinerea eritrocitelor timp de 30 de minute în baie de 37°C, după care se centrifughează şi se compară eprubetele cu unele martor ce conţin eritrocite normale spălate. Pentru a face mai sensibilă tehnica, o eprubetă cu eritrocite acidifiate este ţinută la 56° timp de 30 de minute (complementul fiind distrus la această temperatură), iar o altă eprubetă este ţinută, timp de 30 de minute, la o temperatură de 4°, după care toate eprubetele sînt incubate la cald.

Deşi acest test este folosit pentru stabilirea diagnosticului de hemoglobinurie paroxistică nocturnă (HPN), el apare pozitiv şi în ciroza hepatică, anemia diseritropoietică ereditară (HEMPAS), sau poate fi negativ în formele HPN în care populaţia eritrocitelor complement sensitive este redusă, fiind necesare teste mai sensibile.

2) *Variante ale testului Ham*

a) *Testul Crosby* este o variantă a testului Ham în care se cercetează în plus influenţa trombinei asupra hemolizei. Natura acestei creşteri a hemolizei nu este lămurită; se pare că trombina ar acţiona ca o enzimă proteolitică.

b) *Testul cu sucroză* sau cu *apă zaharată* constă în incubarea eritrocitelor în soluţie izotonică îndulcită. Testul apare pozitiv în HPN prin ataşarea la membrana eritrocitară a unor componente ale complementului care reduc concentraţia ionică a acesteia, permiţînd astfel o mai bună plasare a acestor enzimate să se organizeze în vederea formării de orificii hemolitice.

Scanned with OKEN Scanner

4. TESTE IMUNOLOGICE DE EVALUARE A HEMOLIZEI

a. **Cercetarea izo- și autoimunizării.** Spre deosebire de sistemul ABO unde anticorpii contra antigenelor absente sînt totdeauna prezenți în ser (anticorpi regulari), în celelalte sisteme prezența anticorpilor este patologică, datorindu-se, fie izoimunizării (sarcini sau transfuzii), fie autoimunizării (alterarea antigenelor proprii sau a celulelor formatoare de anticorpi) (fig. 7-41).

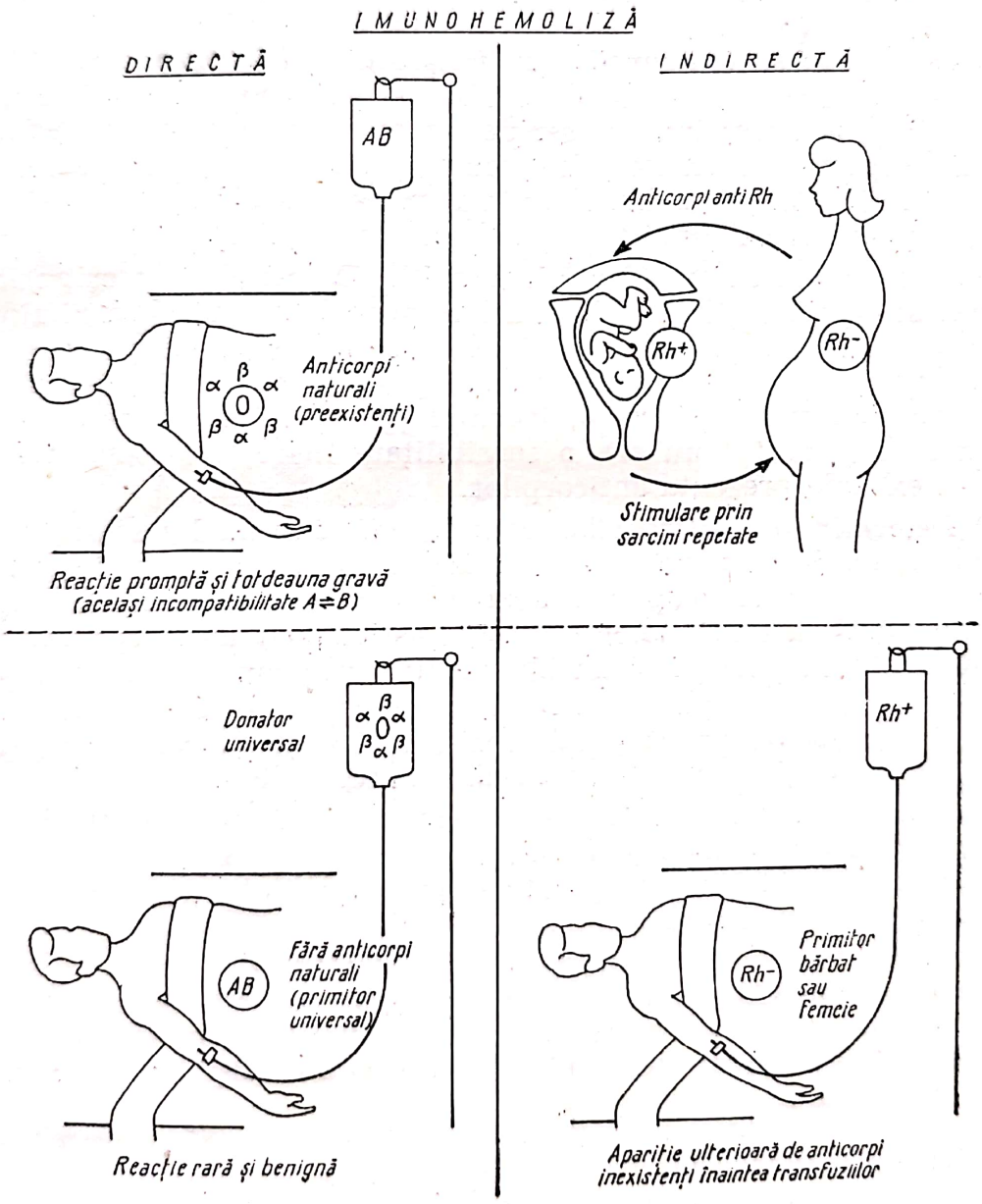


Fig. 7-41. Reprezentare schematică a mecanismelor de producere a imunohemolizei directe și indirecte prin transfuzii și prin sarcină.
Legenda: O, A, B, AB, Rh=antigene (aglutinogene); α și β = anticorpi preexistenți în sîngele primitorului (aglutinine).

Cercetarea anticorpilor antieritrocitari neregulari se face prin procedee care variază după proprietăţile acestora şi anume:

— după felul acţiunii lor (aglutinine sau hemolizine);

— după temperatura la care acţionează (la cald sau la rece);

— după modul în care acţionează (compleţi sau incompleţi); anticorpii incompleţi (monovalenţi) se deosebesc de cei compleţi prin faptul că produc aglutinarea numai în mediu albuminos sau după tratarea prealabilă a eritrocitelor cu enzime proteolitice (papainare) sau în prezenţa serului antiglobulinic.

1) *Suspendarea eritrocitelor în medii diferite de serul sanguin*

a) *Determinarea anticorpilor antieritrocitari în mediu salin.* Aglutinarea unor eritrocite de grup O, spălate şi suspendate în ser fiziologic, adăugate la diluţii crescînde de ser de cercetat, pledează pentru existenţa, în serul respectiv, a anticorpilor compleţi (bivalenţi). Aceşti anticorpi sînt de obicei anti Rh. Diluţia cea mai mare a serului care mai determină aglutinarea reprezintă titrul salin al anticorpilor.

Pentru cercetarea specificităţii anti-Rh (D), paralel cu eritrocite Rh negative, se testează şi cele Rh pozitive, primele trebuind să rămînă neaglutinate (martor negativ). De obicei, acest test se foloseşte în completarea testului în mediu albuminos (care pune în evidenţă, atît anticorpii de tip complet, cît şi anticorpii incompleţi) şi se interpretează în legătură cu acesta. Testul nu are o sensibilitate mare, un rezultat negativ neputînd exclude prezenţa anticorpilor.

b) *Determinarea anticorpilor antieritrocitari în mediu salin cu eritrocite papainate.* Introducerea eritrocitelor de cercetat în mediu papainat sau tripsinizat are ca scop modificarea suprafeţei eritrocitare cu o mai bună „reliefare" a antigenelor în cauză, astfel încît anticorpii incompleţi „monovalenţi" să poată acţiona „bivalent" (prin ambele capete), producînd aglutinarea eritrocitelor. Pentru cercetarea anticorpilor anti-Rh se folosesc eritrocite de grupă O Rh pozitive, spălate, papainate şi suspendate în ser fiziologic, care se pun în diluţii crescînde din serul de cercetat.

Pentru cercetarea anticorpilor autoimuni se folosesc eritrocite de la bolnav, papainate şi suspendate în ser fiziologic (metodă directă), sau eritrocite izogrup străine, papainate şi puse în diluţii progresive din ser de bolnav (metodă directă).

c) *Determinarea anticorpilor antieritrocitari în mediu albuminos.* Anticorpii incompleţi fiind univalenţi nu pot produce aglutinarea decît într-un mediu ce conţine molecule mari (ca serul uman, soluţia de albumină de bou, soluţia de dextran), în timp ce anticorpii compleţi produc aglutinarea şi în ser fiziologic.

După una din tehnici, serul de cercetat se diluează progresiv în ser AB (lipsit de anticorpi neregulari), iar în aceste diluţii se introduc eritrocite de grup O Rh+; în altă serie paralelă se folosesc eritrocite de grup O Rh —. Reacţia se citeşte după 2 ore; dacă apare aglutinarea în seria cu eritrocite Rh pozitive, serul de cercetat conţine anticorpi anti-Rh; diluţia maximă în care se constată aglutinarea corespunde cu titrul serului.

Scanned with OKEN Scanner

Eritrocitele O Rh— nu trebuie să aglutineze în cazul anticorpilor anti-Rh; aglutinarea în ambele serii înseamnă că anticorpii nu au specificitate Rh (D).

Dacă, concomitent cu aglutinarea în mediu albuminos, apare și o aglutinare în mediu salin, se pot trage următoarele concluzii:

— dacă aglutinarea apare exclusiv în mediul albuminos, serul conține numai anticorpi incompleți;

— dacă aglutinarea apare în ambele medii serul poate conține, fie numai anticorpi compleți, fie, atît anticorpi compleți, cît și incompleți;

— un test negativ pentru ambele medii nu exclude prezența anticorpilor, fiind necesară cercetarea acestora cu eritrocite papainate sau prin testul antiglobulinic.

2) *Testul antiglobulinic Coombs.* Metoda cea mai utilizată pentru evidențierea anticorpilor incompleți este testul Coombs, care constă din tratarea suspensiei de eritrocite — care au fixat la suprafața lor anticorpi incompleți — cu ser antiglobulinic (obținut prin imunizarea unor animale la globulina umană). Acești anticorpi antiglobulină umană, avînd caracter bivalent, se leagă specific de anticorpii incompleți de pe eritrocite, producînd aglutinarea acestora.

Există părerea că în realitate toți anticorpii sînt bivalenți, dar la cei monovalenți cea de a doua catenă ar fi împiedicată să reacționeze datorită unei anumite dispoziții spațiale. Acționîndu-se asupra acestor anticorpi cu mercapto-etanol, se produce o modificare a structurii terțiare prin reducerea grupărilor disulfidice, anticorpii astfel modificați putînd determina precipitarea, chiar în mediu salin.

a) *Testul Coombs direct* urmărește punerea în evidență a eritrocitelor fixate deja pe eritrocitele bolnavului. În acest scop se pune în contact ser antiglobulinic, adsorbit în prealabil cu eritrocite umane din grupele A, B și O, pentru îndepărtarea unor anticorpi antieritrocitari, conținuți suplimentar, cu eritrocitele bolnavului de cercetat. (Acestea se spală în prealabil de trei ori cu ser fiziologic pentru a îndepărta de pe suprafața lor alte proteine, nefixate imunologic). Citirea se face după 3 minute. Sîngele se recoltează în cantitate mică (1—2 ml) pe anticoagulant.

Testul Coombs este un test colectiv care confirmă doar că eritrocitele sînt acoperite cu anticorpi blocanți, indiferent de natura acestora.

Este de menționat că, în afară de antigenele eritrocitare proprii din structura membranei, eritrocitele pot fixa la suprafața lor diferite alte antigene (sau haptene, de exemplu unele medicamente), testul Coombs punînd în evidență și anticorpi formați împotriva acestora.

Testul Coombs direct pozitiv se întîlnește, în primul rînd, în cazuri de izoimunizare sau autoimunizare. .În izoimunizarea din sarcină organismul mamei produce anticorpi împotriva eritrocitelor fetale incompatibile ajunse în circulația materna; situația cea mai frecventă este aceea a unei mame Rh negative purtătoare a unui făt Rh pozitiv (anticorpii avînd în acest caz specificitate anti-D). Testul Coombs pozitiv întîlnit în sîngele unui nou-născut este patognomonic pentru boala hemolitică a nou-născutului.

Scanned with OKEN Scanner

În stări de autoimunizare: anemii hemolitice cîştigate idiopatice sau însoţind alte boli, ca unele afecţiuni virale (pneumopatii atipice), colagenoze (mai ales lupusul E.D.), limfoame maligne, cancere etc., apariţia anticorpilor antieritrocitari este rezultatul dereglării sistemului celular al imunităţii cu alterarea toleranţei imunologice (posibil derepresarea unor „clone interzise").

b) *Testul Coombs indirect* urmăreşte punerea în evidenţă a anticorpilor incompleţi nefixaţi pe eritrocite, circulanţi în plasma bolnavului. Pentru efectuarea acestui test este nevoie de ser de la bolnav şi de eritrocite test recoltate de la un individ normal de grupă O. Suspensia de eritrocite test în ser de bolnav se incubează pentru fixarea anticorpilor pe eritrocite, apoi se adaugă ser antiglobulinic. Dacă eritrocitele test au fixat, în primul timp, anticorpii neregulari din serul bolnavului, ele vor fi aglutinate de serul antiglobulinic (fig. 7-42). Interpretarea rezultatelor testului indirect este în principiu identică cu a testului direct.

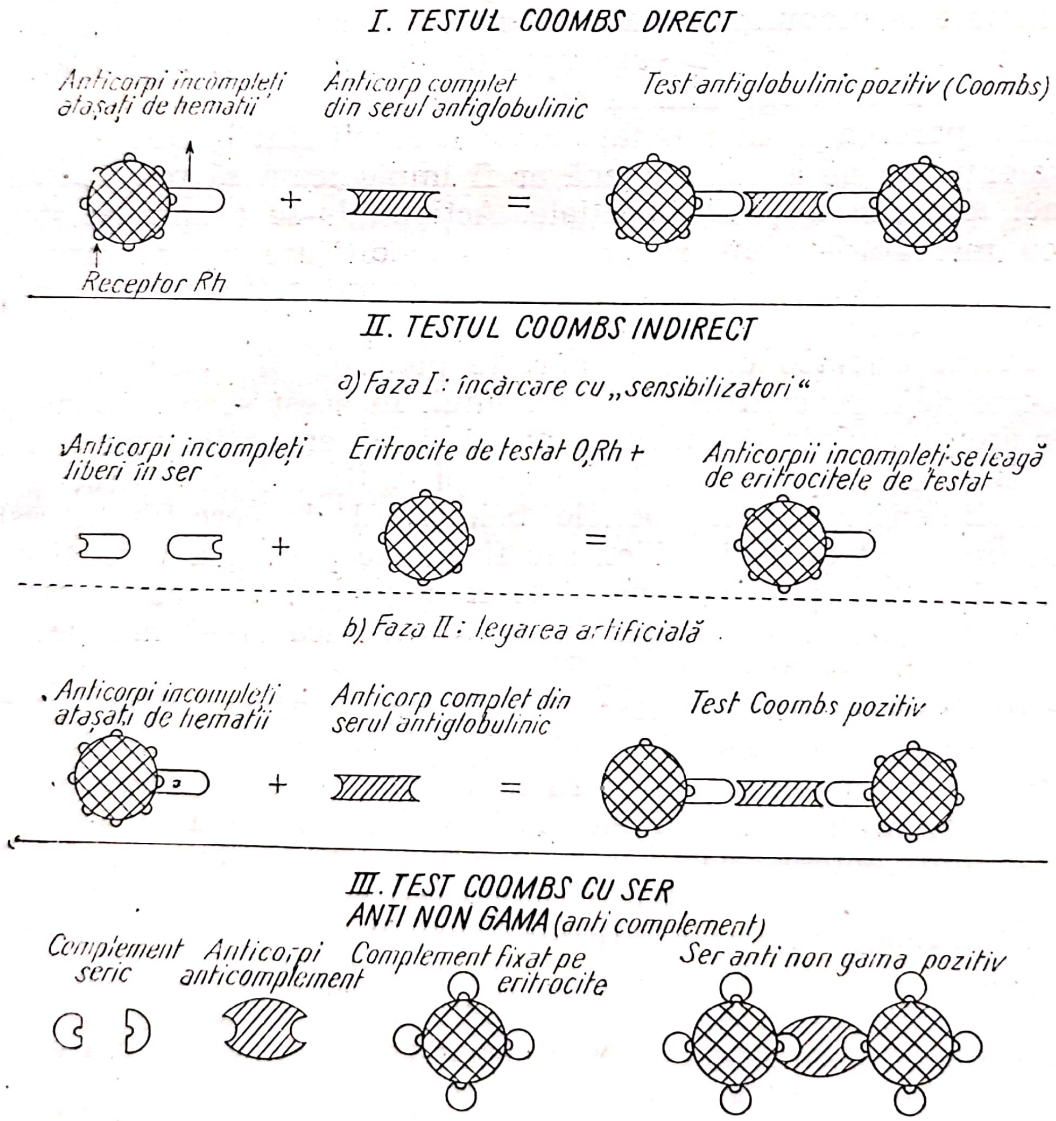


Fig. 7-42. Reprezentare schematică a testului Coombs (testul antiglobulinic), direct, indirect şi cu ser anticomplement (modificat după Hollander).

Scanned with OKEN Scanner

Raportul dintre anticorpii din plasmă și cei fixați pe eritrocite depinde, între altele, de gradul lor de afinitate. Astfel, în cazul unei „avidități" mari, majoritatea anticorpilor sînt legați de eritrocite (test Coombs direct pozitiv), în plasmă rămînînd doar în cantitate redusă (test Coombs indirect negativ). La mama Rh negativă, izoimunizată anti-D, este pozitiv testul Coombs indirect (deoarece anticorpii nu se leagă de eritrocitele materne), pe cînd la făt sînt pozitive ambele teste.

b. **Titrarea complementului.** Punerea în evidență a acestui consum de factori se realizează prin tehnica de titrare a complementului, care se bazează pe relația dintre cantitatea de complement și gradul de hemoliză (exprimată în procente). Graficul acestei relații nu este linear ci are forma unei curbe sigmoide; precizia maximă se obține la stabilirea dozei de 50% hemoliză (CH 50) (fig. 7-43).

c. **Imunoelectroforeza.** Imunoglobulinele migrează electroforetic în sectorul proeminenței β (extremitatea dinspre γ, notată și prin β_2) și proemi-

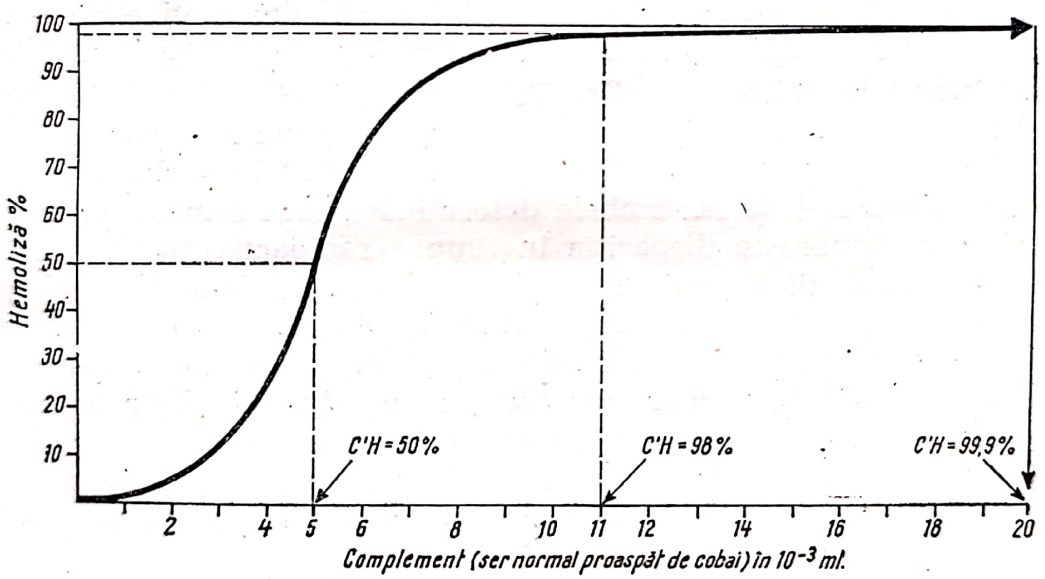


Fig. 7-43. Relația dintre doza de complement și gradul de hemoliză, exprimate în %, curba avînd forma sigmoidă (S prelungit).

La o concentrație a complementului de 5×10^{-3} ml ser normal proaspăt de cobai, hemoliza este de 50%; la $11 \times 10^{-}$ este de 98%, iar la 20×10^{-3} este de 99,9%. Hemoliza totală nu este atinsă, teoretic, niciodată; precizia maximă se obține la determinarea dozei hemolitice de 50% (343).

nența γ. Imunoelectroforeza este în măsură să disocieze acest sector (vezi și fig. 3-4) în cinci componente globulinice: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE.

5. DETERMINAREA DURATEI DE VIAȚĂ A ERITROCITELOR

Durata de viață sau timpul de supraviețuire a eritrocitului normal este astăzi cunoscut cu precizie; cifra unanim recunoscută pentru eritrocitul normal este de 120 de zile.

În ultimele 2—3 decenii au fost descrise numeroase metode pentru determinarea duratei de viață a eritrocitelor, bazate pe tehnici cu izotopi radioactivi. Metodele neizotopice, ca cele experimentale pe animale sau metoda imunologică, preconizată de Ashby, au în prezent doar o valoare istorică, deși au furnizat, la timpul lor, informații prețioase în legătură cu acest subiect. Metodele izotopice au permis eliminarea inconvenientelor tehnicilor imunologice (302, 343).

a. **Testul cu glicină marcată cu ^{15}N sau ^{16}C**

Metoda a fost preconizată de London, Shemin și Rittenberg (1946) și constă în marcarea glicinei, fie cu ^{15}N (azot greu), fie cu ^{14}C. Astfel marcat, acest acid aminat este urmărit în etapele intermediare pînă la încorporarea lui în molecula de hemoglobină, iar apoi pînă la hemoliza eritrocitelor. Prin această metodă nu se marchează întreaga populație eritrocitară, ci doar eritrocitele formate în scurta perioadă în care izotopul este prezent în măduva osoasă. Hemoglobina marcată circulă în sîngele primitorului pînă la liza eritrocitelor respective. Urmărirea duratei de viață cu acești izotopi se utilizează rar în clinică, ^{15}N din motive de măsurători tehnice, iar ^{14}C din motive radiobiologice.

b. **Studiul hemolizei cu ^{51}Cr.** Tehnica marcării eritrocitelor cu ^{51}Cr este identică cu aceea folosită la determinarea volumului eritrocitar total. De altfel, cele două măsurători se cuplează, astfel încît după injectarea eritrocitelor marcate se fac ambele determinări, întîi a masei eritrocitare, după care se urmărește dispariția în timp a radioactivității eritrocitelor, trăgîndu-se concluzii asupra duratei lor de viață. Pe de altă parte, cromul radioactiv, încorporat în eritrocite, emite radiații suficient de puternice pentru a permite detectarea lor externă, în cazul în care eritrocitele se găsesc concentrate în număr mai mare la nivelul anumitor organe (sechestrare hepatică sau splenică, masă eritrocitară măsurată precardiac etc.). Această urmărire durează 3 săptămîni (minimum 2); în prima săptămînă eșantioanele de sînge se recoltează zilnic, iar în următoarele, la 2 zile.

Marcarea eritrocitelor cu ^{51}Cr are avantajul că fixarea se face global, indiferent de vîrsta acestora, iar pe de altă parte, marcarea persistă pe toată durata de viață a eritrocitelor (afară de o pierdere zilnică de circa 1% prin eluție). Astăzi marcarea eritrocitelor cu ^{51}Cr, datorită simplității ei, este procedeul cel mai mult utilizat, fiind o metodă de rutină pentru laboratoarele înzestrate cu tehnica izotopilor.

Determinarea și interpretarea duratei de viață a eritrocitelor cu Cr^{51}. Într-un eșantion de sînge se găsesc amestecate eritrocite de vîrste diferite (de la 1 la 120 de zile) în proporții egale. În stare normală, cînd producția este egală cu distrucția, zilnic se pierde (și se înlocuiește concomitent) circa 1/120 parte din masa eritrocitară (fig. 7-44). Dacă se marchează eritrocitele dintr-un eșantion de sînge, ne-am aștepta (avînd în vedere reprezentarea egală a diferitelor vîrste), să obținem o linie de des-

Scanned with OKEN Scanner

creștere dreaptă, cu timpul de înjumătățire situat în jur de 60 de zile, așa cum se obține în cursul marcării eritrocitelor cu alți indicatori (ca azot greu, $DF^{32}P$ etc.). Prin utilizarea ^{51}Cr urmărirea în timp a radioactivității pune în evidență o curbă cu scădere aproximativ exponențială care, în cazuri normale, atinge 50% din valoarea inițială după circa 30 de

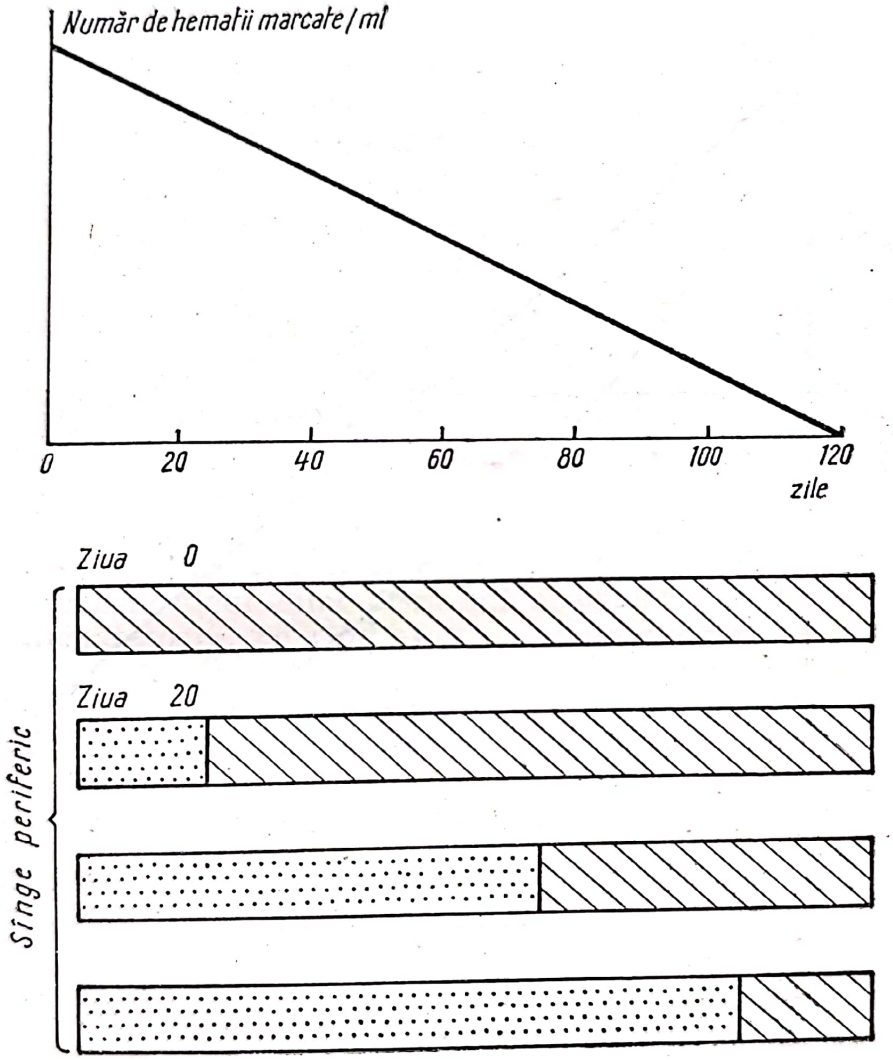


Fig. 7-44. Evoluția radioactivității sanguine după marcarea eritrocitelor circulante (după Berlin, 1964).

În ziua 0 (zero) s-a făcut marcarea tuturor eritrocitelor; progresiv, eritrocitele dispar în ordinea vîrstei, fiind înlocuite cu elemente noi, care nu sînt marcate, ceea ce se traduce printr-o scădere regulată a radioactivității sanguine.

zile (25—33 de zile) (fig. 7-45). Această discrepanță se datorește unei eluții (spălări) lente a cromului din eritrocitele circulante în proporție de aproximativ 1% zilnic, așa încît la calcularea ratei de distrucție eritrocitară trebuie introdusă corecția corespunzătoare. Cromul pierdut din eritrocite este eliminat sau depus în alte țesuturi. În practică se renunță adesea la introducerea în calcul a acestei corecții exprimîndu-se rezulta-

tul ca timp de înjumătățire a radioactivității ^{51}Cr sau ca durată de viață medie aparentă a eritrocitelor (sau, pe scurt ^{51}Cr T1/2) (143, 302). O hemoliză patologică va da o scurtare a T1/2 proporțională cu gradul ei.

Transfuzia încrucișată cu eritrocite marcate. Pentru a diferenția tipul de hemoliză (intrinsecă sau extrinsecă) se utilizează transfuzia de eritro-

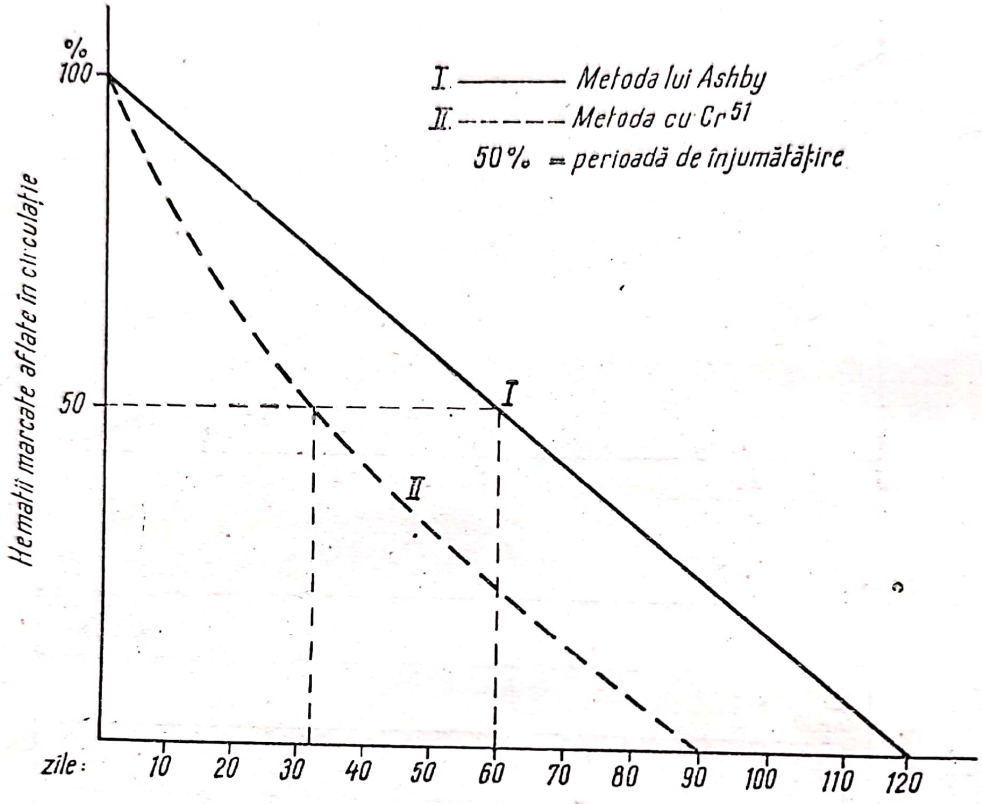


Fig. 7-45. Metode diferite de cercetare a duratei de viață a eritrocitelor.

Linia continuă=aspect obținut prin utilizarea glicinei marcate cu ^{15}N; linia întreruptă=marcarea eritrocitelor cu ^{51}Cr, în care se evidențiază rezultatul eluției (spălării) zilnice de 1% a cromului radioactiv, astfel încît la calcularea ratei de distrucție eritrocitară trebuie introdusă corecția corespunzătoare. Întrucît urmărirea duratei de viață a eritrocitelor nu poate fi efectuată pînă la dispariția totală a ultimelor eritrocite rămase în viață la sfîrșitul intervalului, în practică se determină timpul de înjumătățire a duratei de viață eritrocitare, notat cu T 1/2.

cite marcate, proprii și străine (normale). Un defect intrinsec va scurta numai durata de viață a eritrocitelor patologice (proprii), în timp ce un factor extrinsec va duce la hemoliza, atît a eritrocitelor proprii, cît și a eritrocitelor străine (compatibile, bineînțeles, cu sîngele bolnavului) (tabelul 7-4).

Valoarea T1/2 a ^{51}Cr poate fi reprezentativă pentru durata de viață a eritrocitelor numai în cazul în care în timpul cercetării există un echilibru între producția și distrucția eritrocitară, iar hematocritul (respectiv volumul eritrocitar total) nu se modifică în acest interval. La aprecierea valorilor T1/2 ^{51}Cr, trebuie luate deci în considerare transfuziile, precum și sîngerările externe sau interne survenite în perioada determinării.

Tabelul 7-4

Consecințele transfuziilor încrucișate de eritrocite în funcție de localizarea defectului răspunzător de declanșarea anemiei hemolitice

Subiecții între care se aplică transfuziile de sînge	Normali	Anemii hemolitice intraeritrocitare	Anemii hemolitice extraeritrocitare
Normali	N	N	hemoliză
Anemii hemolitice intraeritrocitare	hemoliză	hemoliză	hemoliză
Anemii hemolitice extraeritrocitare	N	N	hemoliză

c. **Studiul hemolizei cu DF ^{32}P.** În afară de ^{51}Cr, pentru marcarea radioactivă a eritrocitelor, se utilizează și alte substanțe, ca de exemplu DFP (diizopropil-fluoro-fosfat), respectiv DF^{32}P. Acest produs este un ester al acidului fosforic și are proprietatea de a se fixa, prin legături ireversibile, pe acetilcolinesterazele nespecifice ale membranei eritrocitare. Pentru diagnosticul clinic de rutină al bolilor hemolitice, metoda cu ^{51}Cr este satisfăcătoare, pe cînd pentru lucrări de cercetare sau pentru punerea în evidență a unor durate de viață eritrocitare mai puțin scăzute (60—100 de zile) nu prezintă siguranță suficientă, fiind necesară determinarea cu DF^{32}P. În afară de aceasta, marcarea cu DF^{32}P (spre deosebire de ^{51}Cr) dă certitudinea că eritrocitele nu au fost lezate în cursul manipulărilor; cu toate acestea, metoda cu DF^{32}P este mai puțin utilizată, între altele din cauza duratei lungi de urmărire (circa 2 luni) precum și a unor dificultăți tehnice.

d. **Localizarea sechestrării eritrocitare; citiri la suprafața corpului.** În cazul unei durate de viață eritrocitare scăzute este adesea important de știut care este organul principal răspunzător de eliminarea accelerată a eritrocitelor din circulație. De aceea radioactivitatea ^{51}Cr se determină nu numai din probele de sînge extrase, ci și de la suprafața corpului, la nivelul ficatului și a splinei, fiind comparată cu radioactivitatea circulantă, măsurată precordial, cu ajutorul unui contor de scintilație colimat (fig. 7-46). Raportul splină/ficat este în mod normal egal cu 1. În condiții normale, cînd splina nu are o activitate hemolitică importantă, raportul splină/regiunea precordială este de circa 1,5 în ziua 30. În cazuri de hemoliză crescută raportul poate crește la valoarea de 3 sau 4 după prima săptămînă de testare (fig. 7-47).

Studiul detectării externe a locului de sechestrare a eritrocitelor, în afară de interesul științific, are și o valoare practică, de exemplu în legătură cu indicația de splenectomie în bolile hemolitice.

Scanned with OKEN Scanner

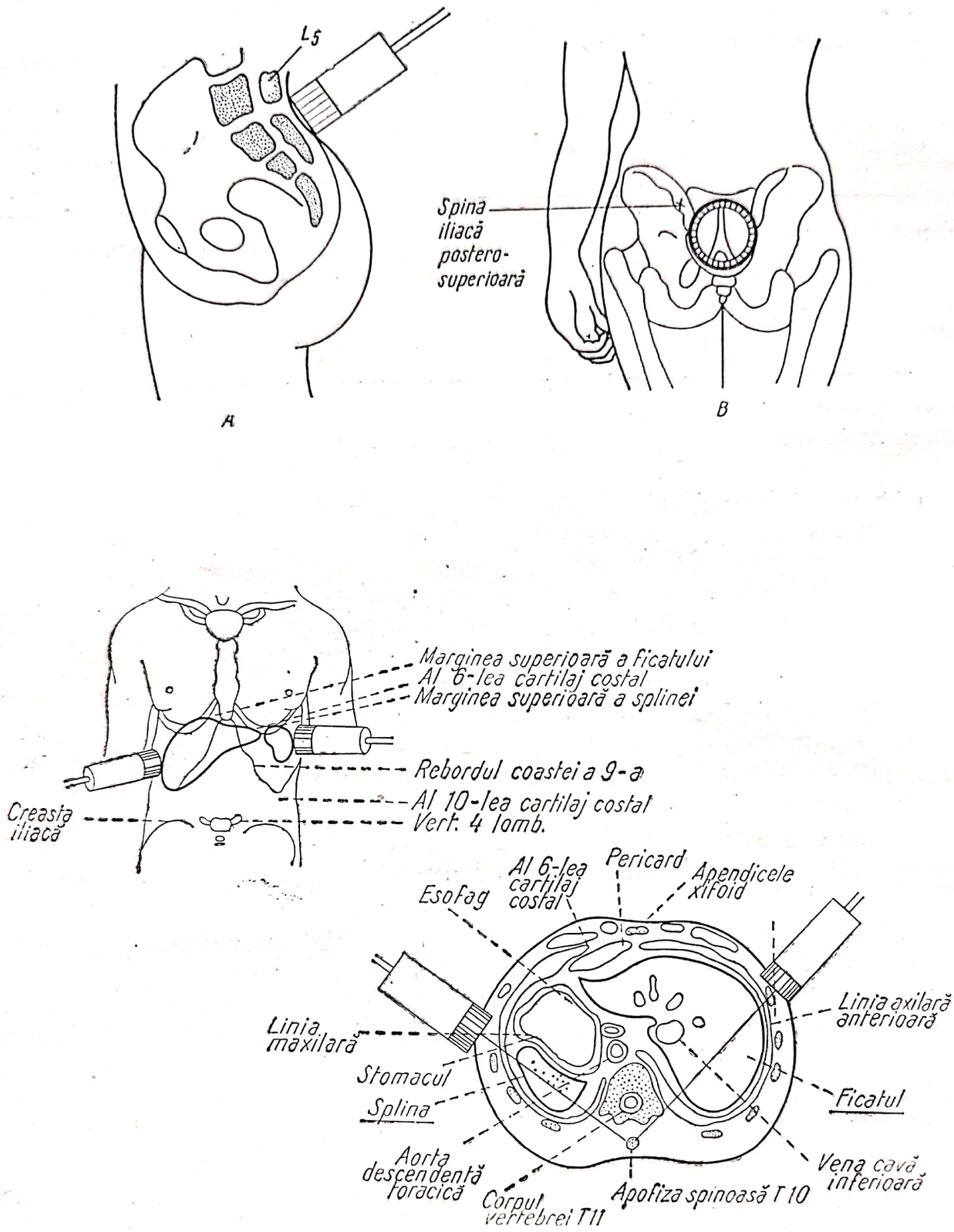


Fig. 7-46. Detectarea externă a radioactivității prin aplicarea direcțională a contorului de scintilație.

Sus: detectare la nivelul sacrului; A=secțiune sagitală; B=proiectare posterioară. *Mijloc stînga:* proiecția suprafeței anterioare a ficatului și a splinei și poziția detectorului de scintilație. *Jos dreapta:* secțiune transversală abdominală la nivelul apendicolul xifoid, al corpului vertebrei D 11, al ficatului și al splinei; de remarcat poziția detectorului de scintilație.

Scanned with OKEN Scanner

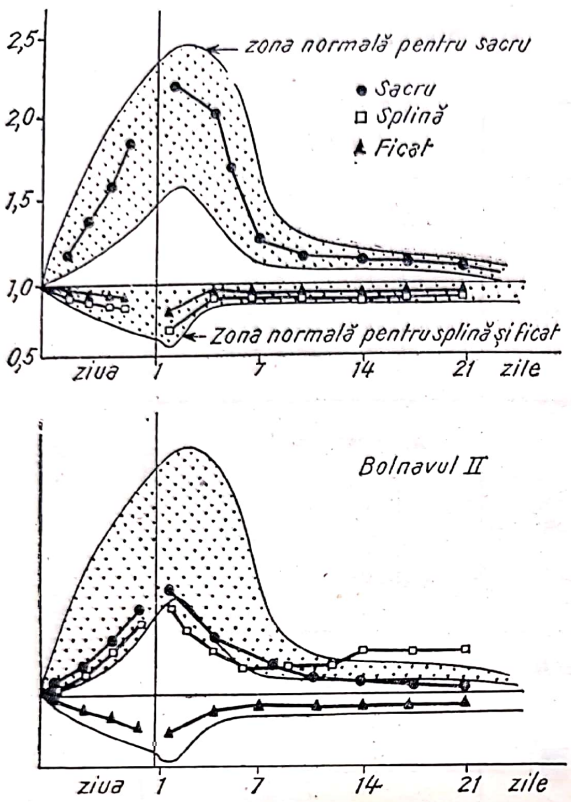


Fig. 7-47. Reprezentarea grafică a citirilor externe a radioactivității. Detectarea eritrocitelor marcate cu ^{51}Cr la nivelul măduvei (sacru), a splinei și a ficatului la un individ normal, în comparație cu un bolnav cu eritropoieză extramedulară și sechestrare splenică crescută (după A. Vîlcu, Ag. Xenachis, I. Marcu, C. Câmpeanu, I. Teitel, 1973) (328).

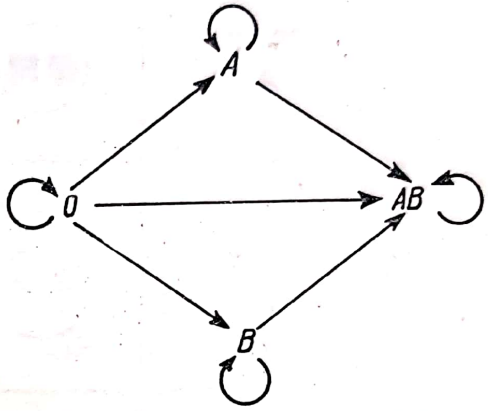


Fig. 7-48. Schema de compatibilitate transfuzională în sistemul ABO. Fiecare grup sanguin este donator și primitor de la grupul propriu. Grupul O apare ca „donator universal", iar grupul AB este „primitor universal".

C. ANEXĂ: DETERMINAREA GRUPELOR SANGUINE

1. DETERMINAREA GRUPELOR SANGUINE ÎN SISTEMUL ABO

(fig. 7-48)

Pentru determinarea grupelor sanguine în sistemul ABO se folosesc obligator două metode complementare, determinarea antigenelor și determinarea aglutininelor (fig. 7-49).

a. **Cercetarea antigenelor** (aglutinogenelor) *prezente la suprafața eritrocitelor.* Această metodă, numită și proba *Beth-Vincent,* este tehnica de bază în determinarea grupelor sanguine. Eritrocitele de cercetat se pun în contact cu seruri test specifice anti A, anti B și anti A+B (fig. 7-50).

b. **Cercetarea aglutininelor serice** (proba Simonin) constă în determinarea naturii anticorpilor prezenți în serul sîngelui de cercetat prin punerea lui în contact cu eritrocite deja testate (prelevate din flacoane de sînge pregătit pentru transfuzii). Folosirea ei este o verificare a metodei precedente.

c. **Proba de compatibilitate directă.** Ca un control suplimentar, după determinarea grupei sanguine prin cele două procedee notate, se efectuează obligator punerea în contact a serului bolnavului ce urmează să

Scanned with OKEN Scanner

fie transfuzat, cu eritrocitele donatorului. În felul acesta se descoperă o eventuală greşeală, fie la determinarea grupei, fie în existenţa unei incompatibilităţi în alt sistem decît ABO.

	HEMATII	PLASMĂ
GRUPA A	Antigene A	Anticorpi anti A
GRUPA B	Antigene B	Anticorpi anti B
GRUPA AB	Antigene A şi B	Fără anticorpi
GRUPA 0	Fără antigene A şi B	Anticorpi anti A şi anti B

Fig. 7-49. Reprezentare schematică a antigenelor şi anticorpilor din sistemul ABO pe eritrocite şi în plasmă.

2. DETERMINAREA ANTIGENELOR DIN AFARA SISTEMULUI AB

După cum s-a arătat (pag. 182), se cunosc pînă în prezent peste o duzină de grupuri antigenice eritrocitare, unele puternice, iar altele foarte slabe şi extrem de rare. Securitatea transfuzională pe baza celor patru grupe majore este suficientă pentru a evita un accident imediat, dar ea este incompletă şi nu pune la adăpost pe primitor de anumite accidente hemolitice dacă acesta a fost imunizat prin transfuzii anterioare. Pentru a evita, pe cît posibil, aceste complicaţii posttranfuzionale este necesară cercetarea sistematică a anticorpilor imunizanţi la primitor.

a. **Determinarea antigenelor din sistemul Rh.** Grupul Rh fiind format dintr-un complex antigenic (Dd, Cc, Ee), determinarea acestui sistem este bine să se facă pe rînd pentru fiecare componentă antigenică.

1) *Determinarea factorului RhO (D).* Eritrocitele de examinat se pun în contact cu ser anti D; acesta trebuie să fie preparat cu un înalt grad de specificitate (nu trebuie să conţină anticorpi contra antigenelor din sistemul ABO sau celelalte antigene Rh). Amestecul se face pe lama care se pune apoi într-o cutie Petri acoperită (avînd în

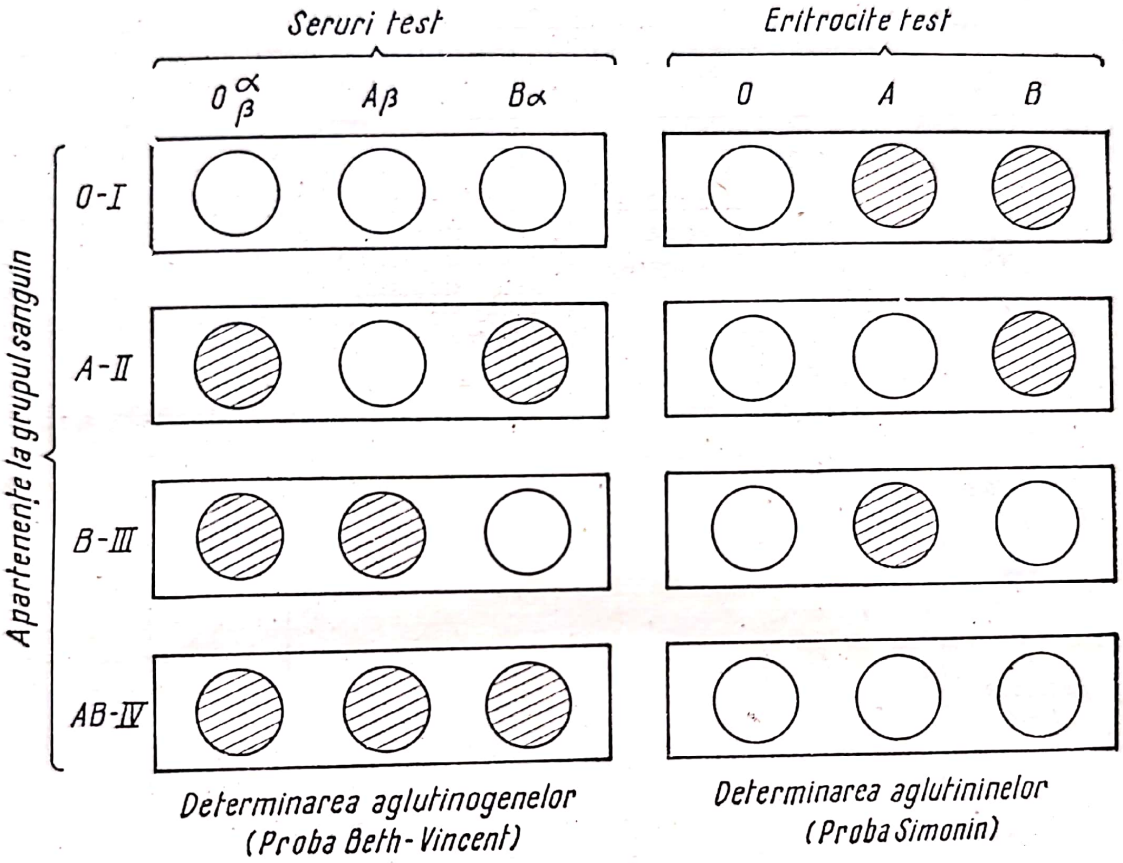


Fig. 7-50. Reprezentare sinoptică a determinării grupelor sanguine prin proba Beth-Vincent (determinarea aglutinogenelor) şi prin proba Simonin (determinarea aglutininelor).

interior hîrtie de filtru umezită), incubîndu-se timp de o oră la 37°. Recoltarea sîngelui se face de obicei fără anticoagulant (pe sînge cu coagulant aglutinarea este mai slabă şi apare mai tardiv).

O eroare în determinarea grupei Rh are consecinţe grave; chiar dacă nu provoacă nici un accident hemolitic imediat, transfuzarea de sînge Rh pozitiv unei femei Rh negative determină o izoimunizare care va duce la apariţia bolii hemolitice a nou-născutului încă de la prima sarcină. Cauzele de eroare cele mai frecvente care pot da rezultate fals pozitive sau fals negative sînt anemiile hemolitice cîştigate prin auto-anticorpi, prezenţa antigenului D^u. Eliminarea acestor erori se face prin folosirea unor medii de suspensie adecvate şi a unor seruri test mai specifice.

2) *Determinarea antigenelor C şi E.* Un donator testat exclusiv cu ser anti D nu poate fi considerat Rh negativ pentru cele-

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 7-5

Consecințele asupra nou-născutului care pot rezulta din cupluri a căror Rh este identic sau diferit

Nr. crt.	Mama	Tatăl	Conduita de urmat
1	Rh+	Rh+ sau Rh−	Nici o problemă
2	Rh−	Rh−	Nici o problemă
3	Rh−	Rh+	Supraveghere serologică sistematică pentru depistarea unei imunizări (test Coombs indirect pozitiv — 5% din cazuri)

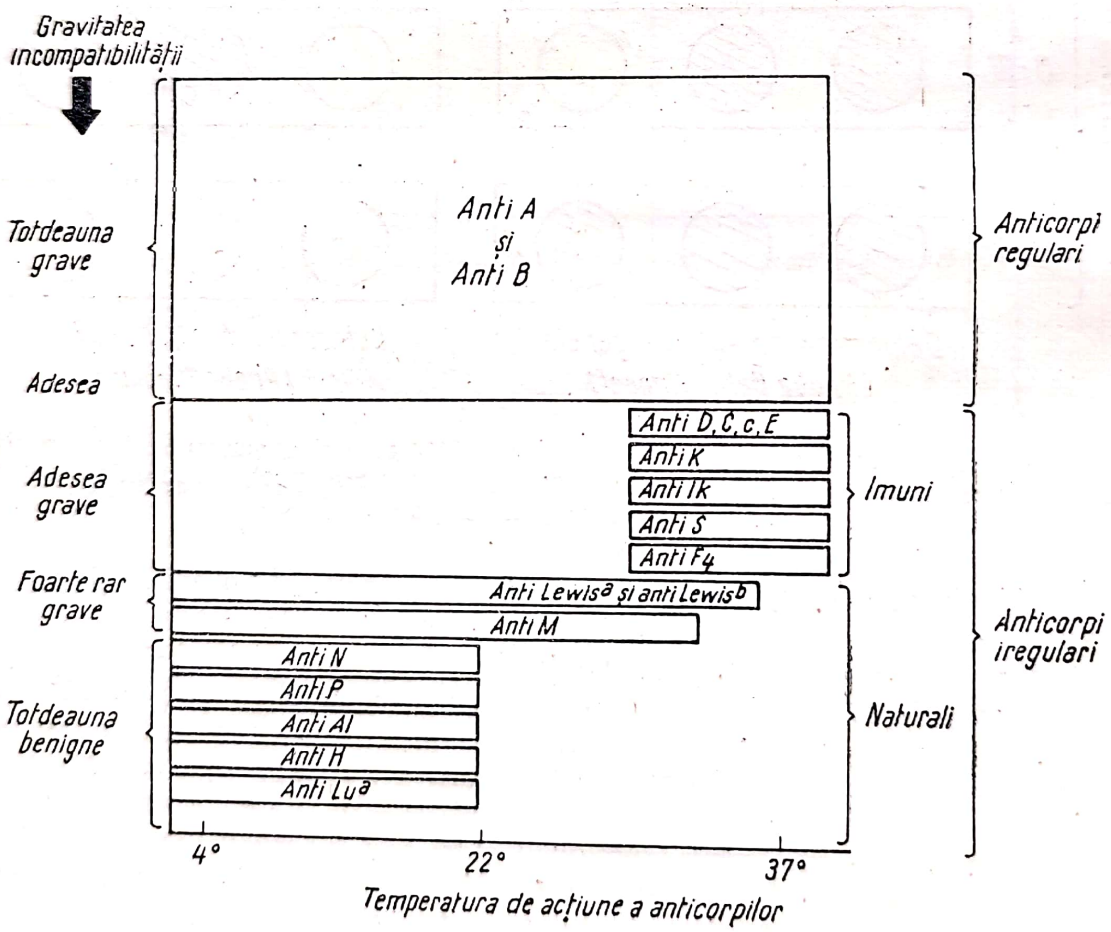


Fig. 7-51. Reprezentarea schematică a anticorpilor regulari și neregulari, a gravității rezultate din conflictul antigen-anticorp și a temperaturii optime de acțiune a acestora.

lalte antigene din acest sistem; determinările (dacă este posibil) se fac după aceeași tehnică și pentru antigenele C și E, utilizîndu-se serurile specifice respective. Vor fi considerate Rh negative numai persoanele ale căror eritrocite nu vor fi aglutinate de nici unul din cele trei seruri (anti D, anti C și anti E). De aceea, sîngele unui donator Ccddee sau ccddEe nu va fi transfuzat unui primitor Rh negativ (dd) care ar putea fi de tipul ccddee. Persoanele Cde și cdE sînt considerate donatori Rh pozitivi și vor trebui să primească sînge Rh negativ de tipul cde.

În practică determinarea „grupei" Rh se face numai pentru componenta antigenică D, care este cea mai frecventă și cea mai puternică, responsabilă de majoritatea accidentelor prin incompatibilitate de grup sanguin (după antigenele din sistemul ABO) (tabelul 7-5).

b. **Cercetarea altor antigene de grup sanguin.** Adesea apare necesar ca determinarea grupei sanguine să fie completă cu testări în afara sistemului ABO și Rh; aceste determinări sînt însă mai delicate. Dintre ele cele mai importante sînt grupele Kell și Duffy. Antiserurile respective au fiecare o specificitate proprie maximă pentru anumite condiții de testare (temperatură, mediu salin sau albuminos etc.) (fig. 7-51).

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

(selectivă)

1. ADAMSON I. W., FINCH C. A. — Erythropoïetine et érythropoïese, *Nouv Rev. Fr. Hématol.*, 1967, 7, 2, 157—160.
2. ALLARD J. P., ROCABOY J. C. — Porphyrines et porphyries, *Arch. Med. Norm.*, 1972, 7, 533—548.
3. AMARE M., LAWSON B., LARSEN W. E. — Active Extrution of Heinz Bodies in Drug Induced Haemolytic Anaemia, *Brit. J. Haematol.*, 1972, *23*, 2, 215—219.
4. ANDRONESCU A. — Embriologie, Lit. IMF Buc., 1963.
5. ANGELESCU V. — Embriologie, Ed. med. Buc., 1963.
6. ARINKIN M. J. — Intravitale Untersuchungsmethode des Knochenmarks, *Folia haematol.*, 1929, 38; 233.
7. ARNO., MOTULSKY D. M. — Hereditary Disorders of Erythrocyte Metabolism. Ed. Copyright Grune et Stalton Inc. U.S.A., 1968.
8. ATHANASIU A. — Hipersplenismul, Ed. med. Buc., 1971.
9. AYRAL D. — Les fonctions cellulaires de l'ADN et de l'ARN. *Cah. Méd. Lyon*, 1972, *48*, 33, 3839—3854.
10. BACIU I. — Fiziologie, Ed. did. pedag. Buc., 1970.
11. BACIU I., DOROFTEIU M., OLTEANU A., PAVEL T., RODICA DANIELO — Biogeneza eritropoietinei, Nota II. Mecanisme enzimatice extrarenale, *Fiz. norm. şi pat.*, 1973, *19*, 127—136.
12. BACIU I., DOROFTEIU M., OLTEANU A., VASILE V. — Proprietăţi antigenice ale eritropoietinei (tipuri de anticorpi generaţi de eritropoietină), *Fiz. norm. şi pat.*, 1971, *17*, 203—216.
13. BACIU I., STOICA N., RĂDUCANU N. — Rolul hipotalamusului posterior în reglarea eritropoiezei, *St. cerc. fiziol.* 1968, *13*, 1, 15—23.
14. BALŞ M. — Aspecte şi posibilităţi actuale de modernizare ale laboratorului clinic, *Viaţa med.*, 1967, *14*, 6, 363—377.
15. BENETATO G. — Elemente de fiziologie normală şi patologică, Ed. medicală Buc., 1962.
16. BENKE O. — Microtubules et microfilaments. *Triangle, Bâle*, 1974, *13*, 1, 7—16.

16 a. BENTEGEAT J., VERGER P., BOISSEAU M., SAN JUAN B., SERVILLE F., KIRSCH C. — L'elliptocytose constitutionelle, *Ann. Pediat.*, 1973, *20*, 4, 317—326.

17. BERCEANU ŞT. — Constantele biologice morfostructurale ale sîngelui normal şi patologic, Din vol. Constantele clinico-biologice, Ed. med. Buc., 1964.
18. BERCEANU ŞT., GOCIU MARIANA, GROZEA PETRE — Sistemul reticulo-endotelial, Ed. med. Buc., 1967.
19. BERGMEYER H. U. — Methods of Enzymatic Analysis, Ed. Academic Press, New York, 1974, vol. 1—4.

Scanned with OKEN Scanner

20. BERNARD J. — Maladies du sang et des organes hématopoïetique, Ed. Flammarion Paris (Mis à jour 1974).
21. BERNARD J., LEVY J. P., CLAUVEL J. P., RAIN J. D. — Abrégé d'Hématologie, Ed. Masson Paris, 1971.
22. BERTHIER R., BOST M., MARCILLE G., HOLLARD D., SUCCILLON M. — Erythropïetine et syntese de l'hémoglobine, étude „in vitro". *Nov. Rev. Fr. Hématol.*, 1970, *10*, 4, 445—460.
23. BERTHILLIER G., GOT R., LOUSOT P. — Conception actuelles sur les régulations allosteriques, *Cah. Méd. Lyon*, 1970, *46*, 23, 1991—2001.
24. BESSIS M. — Naissonce, vie et mort des globules rouges, Ed. Sandoz, Bâle, 1966.
25. BESSIS M. — Cellules du sang, Ed. Masson, Paris, 1972.
26. BESSIS M., BOISFLEURY A. de — Etude des différentes étapes de l'érythrophagocytose par microcinématographie et microscopie électronique a balayage, *Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, 1970, *10*, 2, 223—242.
27. BESSIS M., BRETON-GORIUS J. — Etude au microscope électronique des granulations ferrugineuses des erytrocytes normaux et pathologiques, *Rev. Hématol.*, 1957, *12*, 43.
28. BESSIS M., DÖBLER J., MANDON I. — Discocytes et échinocytes dans l'anemie à cellules falciformes. II. Disposition des polymeres d'hémoglobine. *Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, 1970, *10*, 6, 63—74 şi 10, 793—800.
29. BESSIS M., MANDON P. — La microspherulation et les formes myeliniques des globules rouges. Examen comparé au microscope électronique a balayage et à transmission, *Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, 1972, *12*, 4, 443—454.
30. BESSIS M., PRENANT M. — Topographie de l'apparition des spicules dans les érythocytes créneles (échinocytes). *Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, 1972, *12*, 3, 351—364.
31. BESSIS M., WEED R. I., LEBLOND P. F. — Red cell shape. Physiology-pathology-ultrastructure, Ed. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1973.
32. BESSIS M. — Living Blood Cells and their Ultrastructure, Ed. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1973.
33. BEST C. H., TAYLOR N. B. — Bazele fiziologice ale practicii medicale, Ed. med. Buc., 1958.
34. BEUHAMON J. P. — Les icteres à bilirubine non conjugée, *J. méd. Montpellier*, 1973, *8*, 3, 37—46.
35. BEUTLER E. — Red cell metabolism, Ed. Grune and Stratton New York and London, 1971.
36. BEUZARD Y., BRUN B., COHENSOLAL M. — Hemoglobinopathies par anomalie de structure, *Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, 1971, 11, 61.
37. BILSKI-PASQUIER G. — Metabolisme du fer, *Sem. Hôp. Paris*, 1971, *47*, 20, 1296—1299.
38. BINET J. L., CHOMETTE G., DEBRÉ P., D'ATHIS P. — L'utilisation des appareils a analyse automatique d'image dans la lecture de la biopsie de moëlle. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, 1973, *13*, 3, 436—441.
39. BIRD G. W. G. — Membrane Abnormalities in Polyagglutinable Erythocytes, *Acta Haematol.*, 1972, *47*, 4, 193—199.
40. BOIVIN P. — L'Hemolise, *Rev. Prat.*, 1966, 16, 12 bis, 1671—1682.
41. BOIVIN N. P. — Enzymopathies érythocytaires secondaires et acquises, *Presse méd.*, 1970, 78, 4, 157—158.
42. BOIVIN P. — Progrès dans les anémies hémolitiques congénitales, *Rev. Prat.*, 1969, 19, 91—106.
43. BOIVIN P., FAUVERT R. — L'érythopoïetine en pathologie humaine, *Path. Biol.*, 1967, 15, 677—685.
44. BOIVIN P., GALAND G., AUDOLLENT M. — Erythroenzymopathies acquises. 1. Anomalies quantitatives observées dans 100 cas d'hémopathies diverses. *Path. Biol.*, 1970, *18*, 3—4, 175—187.
45. BOVIN P., HAKIM I. — Les variantes de la glucose-6-phosphate-déhydrogénase, *Path. Biol.*, 1969, *17*, 11/14, 629—635.

Scanned with OKEN Scanner

46. BOIVIN P., LEVY J. P., LORTHOLARY P. — Examens de laboratoire en hématologie, *Rev. Prat.*, 1964, *14*, 34, 99—136.
47. BOLL IRENE — Leitfaden der cytologischen Knochenmarck — Diagnostic, Ed. J. F. Lehmanns — München, 1973.
47 a. BONN F., CADIOU M., SORIA J. — Cytochimie en hématologie, *Gaz. méd. France*, 1974, *81*, 33, 4531—4540.
48. BOUREL M., PAWLOTSKY V., LENOIR P., GUILLY Y. — Etude sur les vitesses der sédimentation globulaire. *Ceh. Coll. Méd.*, 1967, 3, 1—7.
49. BOYER C., BOIVIN P. — Anémies hémolytiques par déficit enzymatique du globule rouge, *Conc. Méd.*, 1972, *30*, 9, 6157—6162.
50. BRACHET J., MIRSKY A. — The Cell. Biochemistry, Physiology, Morphology, vol. 1—5. Ed. Academic Press, New York, London, 1961.
51. BRAIN M. C., DACIE J. V., MOURIHANE D. O'B. — Microangiopathic hemolitic anemia: the possible role of vascular lesion in pathogluesis. *Brit. J. Haematol.*, 1962, *8*, 358—374.
52. BRATU V. — Methemoglobinemia, considerații teoretice și implicații practice, *Doc. Haemat.*, 1972, 2, 91—98.
53. BRATU V. — Hemoglobine și hemoglobinopatii. *St. Cerc. Bioch.*, 1969, *12*, 3, 275—287.
54. BRATU V., LORKIN P. A., LEHMAN H., PREDESCU C. — Haemoglobin București β 42 (CD 1) Phe → Leu, Cause of Unstable Haemoglobin Haemolytic Anaemia, *Biochim, Biophys, Acta*, 1971, *251*, 1—6.
55. BROWN C. H. — Bone marrow necrosis; a study of seventy cases, *Hopkins Med. J.*, 1972, *131*, 3, 189—203.
56. BRETON-GORIUS J. — Utilisation de la diaminobenzidine pour la mise en évidence au microscope électronique, de l'hémoglobine intracellulaire, *Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, 1970, *10*, 2, 243—256.
57. BREWER G. J., TARLOV A. R., ALVIN G. A. S. — Methemoglobin reduction test; a new simple, in vitro test for identifying primaquine — sensitivity. *Bull. WHO*, 1960, *22*, 633.
58. BROCK D. J. H., MAYO O. — The Biochemical Genetics of Man Ed. Academic Press, London, New York, 1972.
59. BROWN CLARANCE H. — Bone marrow necrosis, *Hopkins Med. J.*, 1972, *131*, 3, 189—203.
60. BRUYN P., MICHELSON S., THOMAS T. — The migration of blood cells of the bone marrow through the sinusoidal wall. *J. Morph.*, 1971, *133*, 417.
61. BULL B. S., KUHN I. N. — The Production of Schistocytes by Fibrin Strands (A Sacanning Electron Microscope Study), *Blood*, 1970, *35*, 1, 104—110.
61. a. BURCHARDT R. — Farbatlas der klinischen Histopathologie von Knochenmarck und Knochen, Ed. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1970.
62. BUTOIANU E., NICOARĂ S. — Vademecum hematologic, Ed. med. Buc., 1972.
63. CĂDERE-TICĂU S., POPESCU E. R. — Date noi cu privire la indicațiile tehnice și interpretarea unei mielograme, *Viața med.*, 1970, *18*, 2, 87—90.
64. CĂLĂRAȘU EUGENIA, APĂTEANU V. — Profilaxia și tratamentul accidentelor transfuzionale II, Accidente imunologice, *Doc. Haemat.*, 1970, 7, 7—15.
65. CALLENDER SHEILA T. — Oral Iron Therapy, *Brit. J. Haemat.*, 1970, *18*, 1, 123—125.
66. CÂMPEANU L., IONESCU M. D., ILINCA DOINA — Aspecte ultrastructurale ale celulelor din sîngele conservat. Referat, *A 3-a Conf. Naț. Hemat. Buc.*, 1972.
67. CAMUS J. P. — Indications et contra-indications de la biopsie-osseuse. *Rev. Prat.*, 1971, 23, Editorial.
68. CĂPÂLNA S. — Biochimie dinamică, Ed. med. Buc., 1971.
69. CASPERSSON T., ZECH L., LINDSEN J. — Identification des chomosomes humains par des methodes de fluorescence. *Triangle*, 1972, *11*, 3, 73—80.
70. CHAYEN J., BITENSKY L., BUTCHER R. Q. — Practical histochemistry, Ed. John Willey and Sons, London, New York, Sidney, Toronto, 1973.

Scanned with OKEN Scanner

71. CHRISTOL D. — Pathologie du systeme réticulo-endothelial. *Encycl. méd. Chir.* (Sang.), 1963, 13 034, A 10.
72. COMOROȘAN S., SOLOMON S., VIERU S., SANDRU D. — Un nou punct de vedere privind mecanismul de acțiune al enzimelor (Implicații biologice și medicale). *Med. Internă*, 1969, *21*, 11, 1351—1357.
73. CANTACUZÈNE J. — Sur les variations quantitatives et qualitatives des globules ranges provoquées chez le lapin par les injections de serum hémolitique. *Ann. Inst. Pasteur*, 1900, 14, 378.
74. CAZAL P. — L'apparente dualité du système lymphoïde. Sa signification physiologique dans l'immunité et la tolerance (I—II). *Presse Méd.*, 1968, *74*, 47 și 48, 2401—2404 și 2469—2474.
75. CHATAING B. — L'hémolise, *Cah. méd. Lyonnais*, 1972, *48*, 7, 605—611.
76. COLIȚĂ ADRIANA — Contribuții la studiul anemiei hemolitice microangiopatice, Teza, I.M.F. Buc., 1974.
77. COLLOMBEL C. — Les hémolises d'origine toxique et médicamenteuse. Leur mécanisme d'action. *Cah. méd. lyonnais*, 1972, *48*, 9, 857—876.
78. COMBRISSON A. — Le fer dans l'organisme, *Vie Médicale*, 1972, 30, 3493—3499.
79. CONDACSE A., RĂDULESCU I. C., CAROLI T. — Porfiriile. Biochimie-clinică, Ed. med. Buc., 1970.
80. CORCINO J. J., WAXAN S., HERBERT V. — Absorption and Malabsorption of Vitamin B 12, *Amer. J. Med.*, 1970, *48*, 562—569.
81. COTĂESCU I. — Fiziologie celulară, Ed. med. Buc., 1971.
82. CRĂCIUN E. C. — Contribuții la studiul corpilor inelari ai lui Cabot, Teză, Buc., 1922.
83. CREYSEL R. — Anatomie normale et pathologique de la molécule hémoglobinique, *Cah. med. lyonnais*, 1972, *48*, 11, 1139—1159.
84. CRONE N. — Capillary Permeability — Academie Press, Inc. New York and London, 1970.
85. CROSBY N. H. — The control of iron balance by the intestinal mucosa, *Blood*, 1963, *22*, p. 440.
86. CRUCHAUD — Immunofluorescența, origina, posibilități, limite (traducere CDM), *Schweiz. Med. Wsch.*, 1964, 34, 1153.
87. CRUDU ALEXANDRA, BRATU V., PREDESCU C., TEITEL P. — Importanța practică a precizării comportamentului osmotic al eritrocitelor în investigarea anemiilor hemolitice. Referat. *A 3-a Conf. naț. de hematologie*, Buc., 1973.
88. DANIELESCU MARIA, CĂLĂRAȘU EUGENIA, IANCU CORNELIA, SMOCHINĂ ALLA, ROTARU GEORGETA — Sistemul ABO, probleme legate de prezența unor antigene slabe și anticorpi inegulari ivite cu ocazia determinării grupelor în populația țării. Referat. *A 3-a Conf. naț. de hematologie*, *Buc.*, 1973.
89. DEGOS L. — Les fonctions cellulaires de d'ADN et de l'ARN. *Gazette méd. Fr.*, 1970, *77*, 31, 6731—6738.
90. DEGOUVIN R., HOAK J., MILLER S. — Erythoblastic differenciation of stem cells in hemopoietic colonies. *Blood*, 1972, 40, 881.
91. DE GRUCCHY G. C. — Clinical Haematology in Medical Practice — Blackwell Scientific Publications, Oxford London, Edinburg, Melbourne, 1970.
92. DICULESCU I., ONICESCU D., MISCHIU L. — Biologie celulară, Ed. Acad. R.S.R., 1971.
93. DICULESCU I., ONICESCU D., RÎMNICEANU C. — Histologie, Ed. did. și pedag. vol. I., Buc., 1970.
94. DOROFTEIU M., Olteanu A., PAVEL T., MAGDALENA BANEA — Mecanisme de secreție a factorului inhibitor al eritropoiezei. *Fiziol. norm. și pat.*, 1973, *19*, 4, 305—413.
95. DRĂCEA I. — Genetica — Ed. did. pedag. Buc., 1973.
96. DRAGOMIRESCU T., BERCEANU ST. — Technique simple d'appréciation de l'activité phagocytaire des leucocytes circulates. *Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol.*, 1972, *31*, 1, 143—144.
97. DRE:CH CATHERINE — Metode recente de studiu asupra eritropoiezei umane (Reutilizarea fierului hemoglobinic și autoradiografia măduvei după marcarea in vitro). Referat. *A 3-a Conf. naț. de hematologie, Buc.*, 1972.

Scanned with OKEN Scanner

98. DRESCH C. — Production d'érythropoietine au cours de divers états pathologiques, *Presse méd.*, 1968, *76*, 47, 2248.
99. DREYFUS B. — Pathologie medicale (Le sang), Ed. Flammarion, Paris, 1971.
100. DUHAMEL G. — Histopathologie clinique de la moelle osseuse, Ed. Masson, Paris, 1974.
101. DUHAMEL G. — Les inclusions du globule rouge, *Conc. méd.*, 1971, 22, 4119—4122.
102. DUHAMEL G., NAJMAN A., ANDRÉ R. — Interet de la biopsie médullaire dans le diagnostic des lesions organisées non malignes de la moëlle osseuse. *Ann. med. int.*, 1972, *123*, 8/9, 777—782.
103. DUNCAN G. — Bolile metabolismului, Ed. med. Buc., 1966, vol. I și II.
104. EDELMAN G. M. — Antibody Structure and Molecular *Immunology, Science*, 1973, *180*, 4088, 830—840.
104 a. ELION J., WAJCMAN H., LABIE D. — Régulation de la fonction respiratoire de l'hémoglobine chez le sujet normal et en pathologie. *Conc. Méd.*, 1975, *8*, 2, 906—918.
105. EMBERGER J. M., WAGNER A. — L'autoradiographie des chromosomes. Son intérêt dans l'étude du caryotype humain, *J. méd. Montpellier*, 1969, *4*, 8, 331—336.
105 a. ENGLER R., WAKIM A., POINTIS J., RONDEAU Y., JUDON C., JAYLE M. F. — Hémolye intravasculaire. Appréciation par le dosage de h'aptoglobine, de l'hémopexine et de l'orosomucoïde. *Nouv. Presse méd.*, 1957, 4, 20, 1493—1496.
106. ERLICH P. — Farbenanalytische Untersuchungen zur histologie und Klinik des Blutes, Berlin, A. Hirschwald, 1891, p. 104.
107. ERLIGGE R. S. — Métabolisme de la bilirubine, *J. med. Montpellier*, 1973, *8*, 3, 31—36.
108. ESKENASY AL. — Anemiile, Ed. med. Buc., 1955.
109. ESKENASY A., BIANU G. — Hematopoieza normală și patologică, Ed. Acad. R.P.R. — 1957.
110. ETIENNE J., KRULIC M., DE BRAY — Le complement, *Vie med.*, 1973, 17, 2147—2144.
111. FAVAREL-GARRIQUES J. C., CHATEAU J. M. — Mesure du volume sanguin circulant, *Conc. méd.*, 1970, 19, 4525—4542 și 1970, 20, 4536—4542.
112. FELSZEGY E., ABRAHAM A. — Biochimie, Ed. did. pedag. 1972.
113. FINCH C. A. — Body iron exchange in man, *J. clin. Invest.*, 1959, *38*, 392.
114. FREJAVILLE J. P. — Physiopathologie des membranes. *Conc. méd.*, 1970, 49, 9169—9184.
115. FODOR O. — Biologia moleculară și medicina modernă, Ed. med., Buc., vol. II, 1973.
116. FOURCADE C., DESCOTES J. — L'impédance bioelectrique, technique simple pour le diagnostic de la mort cellulaire, *Triangle*, 1974, *13*, 4, 173—184.
117. GAJDOS A. — Médecine et biochimie, Ed. Masson, Paris, 1967.
118. GAJDOS A. — Le rapport entre structure et fonction de l'hemoglobine, *Presse méd.*, 1968, *76*, 38, 1817—1820.
119. GAJDOS A. — La membrane érythrocytaire, *Nouv Presse Méd.*, 1973, *2*, 36, 2405—2410.
120. GASPAR-GODFROID A. — Les mitochondries sont elles d'anciennes bactéries symbiotiques, *Revue med. Liège*, 1974, 28, 6, 192—198.
121. GHIURU RODICA — Activitatea G-6-PD în lichidul sinaptozomial din citoplasma creierului de șobolan. *Teza, IMF Iași*, 1973.
122. GIOSAN N., SĂULESCU N. A. — Principii de genetică, Ed. Agrosilvică, Buc., 1969.
123. GINGOLD N. — Deux femilles spuffrant de β-thalassémie. Quelques considérations d'ordre génetique et géopathologique. *Rev. Row. Med. Int.*, 1969, *6*, 14, 275—282.
123 a. GINGOLD N., GHERMAN I., COMĂNESCU N. — L'astrocitose, une malformation morphologique probablement constitutionelle des globules rouges, *Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, 1967, 7, 2, 313—314.

Scanned with OKEN Scanner

124. GOETZE — Fiziopatologie (trad.), Ed. med. Buc., 1963.
125. GOGUEL A. — L'hémogramme automatisé, *Gazette méd. de France*, 1972, 79, 15, 2439—2447.
126. GOGUEL A. — Valeur globulaire et concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH), *Gazette méd. de France*, 1972, 79, 34, 6171—6175.
127. GOODY W. — Actualité des oligo éléments, *Ciba revue*, 1973.
128. GORDON A. S., ZANHANI E. D. — Mechanism of Erythopoietin Production, *Israel J. Med. Sci.*, 1971, 7, 963—971.
129. GREENWALT T. J., JAMIESON G. A. — Formation and Destruction of Blood Cells, Blackwell Scientific Publications Oxford, London, Edinburg, Melbourne, 1971.
130. GRIGORIU G. — La capacité proliferative de la moelle osseuse. Étude autoradiographique avec la thymidine tritiée. *Rev. Roum. Méd. Int.*, 1965, 2, 123.
131. GROZA P. — Fiziologie, Ed. did. și pedag. Buc., 1966.
132. GROUCHY J. — Techniques nouvelles d'étude du caryotype humaine, *Conc. Méd.*, 1973, *11*, 10 și 17, 6675—6690, și 6893—6908.
133. GUERIN A. R., GUERIN M. T. — Scintigrammes et scintigraphies osseux, *Presse med.*, 1968, *76*, 10, 449—452.
134. GUERIN H., JALLET P., LAGET P. — Le transport actif du sodium à travers la membrane des érythrocytes humains. Aport de la cinetique enzymatique. *Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, 1969, *9*, 6, 873—876.
135. GYGER M., LAMARCHE J., BOILEAU J., LAUALLÉE, LACOMBE M., BONNY Y., D'ANGELO M. G. — Étude comparative de la moelle osseuse par biopsie et par aspiration medullaire, *Union Méd. Canada*, 1974, *103*, 1433—1439.
136. HAGGIS G. M., MICHIE D., MUIR A. R., ROBERTS K. B., WALKER P. B. — Introducere în biologia moleculară, Ed. științifică, Buc., 1968.
137. HALUGA-MARINESCU SPERANȚA, BUZI ELISABETA — Măduva osoasă hematogenă, Ed. med. Buc., 1970.
138. HARRIS J. W., KELLERMEYER R. W. — The Red. Cell — Ed. Commonwealth Fund By Harvard University Press, Cambridge, Messachusetts, 1970.
139. HASAEV A. S. — Unii indici ai metabolismului fierului la gravide și lăuze (trad. CDM). *Akușerstvo i ghinekologhia*, 1969, 2, 26—28.
140. HEALY J. C. — Principe et indications des études du cycle du fer à l'aide du radio fer, *Vie med.*, 1972, *1*, 3499—3506.
141. HEILMEYER L. — Fiziopatologie specială, Ed. med. Buc., 1968.
142. HEILMEYER L. — Blut und Blutkrankheiten, Ed. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, vol. I, 1968, vol. II, 1971.
143. HEILMEYER L., HITTMAIR A. — Handbuch der gesamten Hämatologie, Ed. Urban und Schwartzenberg, München, Berlin, Wien, 1969, 5, partea 3.
144. HESSELDAHL H., LARSEN J. — Hemopoiesis and blood vessels in human yolk sac. An electron microscopic study, *Acta Anat.*, 1971, *78*, 274—294.
145. HOLROYDE C. P., Gardner F. H. — Acquisition of Autophagic Vacuoles by Human Erythocytes. Phisiological Role of the spleen. *Blood*, 1970, *36*, 5, 566—575.
146. HOSAIN F., MARSAGLIA G., FINCH C. A. — Blood ferokinetic in normal man, *J. clin. Inv.*, 1969, *16*, 1—9.
147. HOSSU T. — Concepții actuale în diagnosticul și tratamentul anemiilor megaloblastice, *Doc. Haemat.*, 1971, 2, 9—31.
148. HOSSU T.— Contribuții la studiul deficitului folic în sarcină, *Teză IMF Buc.*, 1974.
149. HOSSU T., PĂRĂSCAN MARGARETA — Hematologie, Edit. did. și pedagog. Buc., 1973.
150. HUEHNS E. R., SHOOTER E. M. — Human haemoglobins, J. *Med. genet.*, 1965, 2. 48—90.
151. HUHN D., STICH W. — Fine structure of blood and bone marrow. An introduction to electron microscope hematology, Ed. Lehmauns — München, 1969.
152. HUMPHREY H. J., WHITE R. G. — Kurzes Lehrbuch der Immunologie, Ed. Thieme Stuttgart, 1971.
153. HUSER H. J. — Importanța diagnostică a izoenzimelor în bolile hematologice (trad. CDM). *Dent. Wschr.*, 1967, 29, 1313.

Scanned with OKEN Scanner

154. IONESCU TÎRGOVIȘTE C. — Funcția endocrină a rinichiului. Eritropoietina renală, *Medicina internă*, 1969, *21*, 6, 759—765.
155. IONESCU-VARO M. — Biologie celulară, Ed. did. pedag. Buc., 1971.
156. IZAK G., LEWIS S. M. — Modern Concepts in Hematology (Simposia of the International Commitee for Standardization in Hematology). Academic Press, Inc. New York London, 1972.
157. IZARN P., EMBERGER — Technique de la biopsie de moelle osseuse et de l'examen histologique des grumeaux prélévés par ponction medullaire simple, *Feuilles Biol.*, 1970, *9*, 54, 27—54.
157 a. JACOB F., MONOD J. — Genetic regulator mechanism in the sinthesis of proteins, *J. Mol. Biol.*, 1961, *3*, 318.
157 b. IZRAEL V. — Maladie de Minkowski-Chauffard. Étude de 229 cas et révue generale. Actualité hematol. Ed. Masson, Paris, 1972.
158. JACOBS P., FINCH G. — Iron for Erythropoiesis, *Blood*, 1971, *37*, 2, 236.
158 a. JAMGHIDI — Bone Marrow Biopsy Needle. Kosmed, Inc. Mineapolis. Minnesota, 55420 U.S.A.
159. JULLIEN P. — Les cellules souches du système hematopoïetique, *Conc. Méd.*, 1969, 42, 7323—7328.
160. KAMIYAMA R. — An electron microscopic study of erytholeukemia with special reference to the structure of erythoblasts. *Acta Path. Jap.*, 1971, *21*, 2, 231—241.
161. KAPLAN J. C. — Les systèmes d'oxido-reduction du globule rouge et leur anomalies. *Nouv Rev. Fr. Hématol.*, 1966, *6*, 6.
162. KARLSON P. — Manual de biochimie, Ed. med. Buc., 1967.
163. KAYDEN H. J., BESSIS M. — Morphology of Normal Erythocyte and Acantocyte Using Nomarski Optics and the Scanning Electron Microscopie, *Blood*, 1970, *35*, 4, 427—436.
164. KEYHANI E., BESSIS M. — Étude au microscopie électronique de l'ilot érythroblastique par la technique de cryo-décapage. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, 1969 *9*, 6, 803—816.
165. KISSIN C., COTTE J. — Les anémies hémolytiques par déficit enzymatique. *Cah. méd. lyonnais*, 1971, *47*, 2, 73—84, și nr. 4, 245—255.
166. KISSIN C., COTTE J. — Glucose-6-phosphate dehydrogénase et génetique, *Ann. Biol. clin.*, 1970, 28, 369—376.
167. KONDI V. — Metodele laboratorului clinic—Examenul organelor hematopoietice, 263—467. Ed. med. Buc., 1964.
167 a. KONDI V., BĂLAN ȘT., MITRICĂ NATALIA. — Boala hemolitică a nounăscutului. Ed. med. Buc., 1975.
168. KONDI V., MITRICĂ NATALIA, IACOBESCU A., BĂLAN ȘT. — Derivate de sînge utilizate în terapeutică, Ed. med. Buc., 1970.
169. KORN E. D. — Current concepts of membrane structure and fonction, Federation Proceedings, 1969, *28*, 1, 6—11.
170. KÜCHMEISTER E. — Diagnostic funcțional clinic, Ed. med. Buc., 1973.
171. LABIE D., DREYFUS J. C. — Les hémoglobinopathies par trouble de synthèse de l'hémoglobine, *Nouv. Rev. Fr. Hémathol.*, 1971, 11, 83.
172. LABIE D., ROSA J. — Structure et génetique des hémoglobine Lepore. *Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, 1967, *7*, 5, 683—690.
173. LAMY M. — Les progrès de la génétique médicale, *Rev. Prat.*, 1969, *18*, 31 bis., 33—41.
174. LANGE D. R., McDONALD T. P., JORDAN T. — Antisers to Erythropoietin: Partial caracterization of two Diferent antibodies, *J. Lab. clin. Med.*, 1969, *73*, 78—80.
175. LANGER E. E., HAINING R. G., LABBE R. F., JACOBS P., CROSBY E. F. — Erythrocyte Protoporphyrin, *Blood*, 1972, *40*, 1, 112—128.
176. LARCAN A., STOLTZ J. F., GENETET B. — Acquisitions récentes dans le domaine de l'hémorhéologie, *Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, 1968, *8*, 4, 469—488.
177. LARGET-PIET L. — Le conseil génétique, *Sem Hôp. Paris*, 1972, *48*, 19, 1363—1366.

Scanned with OKEN Scanner

178. LEDIG M., HAIPTMAN G. R., WAITZ R., MANDEL P. — Étude du métabolisme des phosphopeptides dans les stromas de globules rouges, *Boul, Soc. Chimie. Bioll*, 1970, *52*, 11, 1294—1296.
179. LEHNINGER A. L. — The Mitochondrion, Ed. W. A. Benjamin, INC, New York and Amsterdam, 1965.
180. LEHMANN H., CARRELL R. W. — Variation in the structure of human hemoglobin with particular reference to the unstable hemoglobins, *Brit. Med. Bull.*, 1969, *25*, 14.
181. LE PETIT J. C. — La carte chromosomique de l'homme, *Cah. méd. lyonnais*, 1972, *48*, 8, 755—769 şi 10, 985—994.
182. LEROY J. P., BALOUET G. — La Microscopie en Fluorescence Sa technique, son application în l'histologie et à l'anatomie pathologique, *Biol. méd.*, 1969, *58*, 5, 391—442.
183. LESSIN L. S. — Structure moléculaire de l'hémoglobine cristallisée d'érythrocytes de rat, étudiée par cryo-décapage. *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, 1968, *8*, 4, 423—436.
184. LESSIN L. S., JENSEN W. N., KLUG P. — Ultrastructure of the Normal and Hemoglobinopathic Red Blood Cell Membrane, *Arch. Intern. Med.*, 1972, *129*, 306—319.
185. LESTRADET — Cours de physiologie cellulaire, *Arch. Med. Normandie*, 1972, *6*.
186. LE VILLAIN M. — Les constantes hématologiques de l'enfant, *Gaz. méd. de France*, 1970, *77*, 22, 4763—4770.
187. LEVINE H. — Microangiopathic Hemolytic Anemia: the Pathogenesis of Red Blood Cell Fragmentation, A Rewiew of the Literature. Clinical Aviation and Aerospace Medicine, 1970, *41*, 3, 331—336.
188. LIOTTI F. S., GIOVANNINI E. — Rapporti tra rene e milza nel controllo dell'eritropoiesi, *Haematologica*, 1969, *54*, 5, 351—370 şi 1970, *55*, 11, 681—697.
189. LOUISOT P. — Les fonctions cellulaires de l'ADN et de l'ARN. *Cah. Méd. lyonnais*, 1971, *47*, 6, 447—462.
190. LOZANO-TONKIN C. — La biopsia ossea e le sue indicationi in medicina interna, *Minerva Medica*, 1968, *59*, 96, 5177—5184.
191. LYON MARY F. — Sex chromatin and gene action in the mammalian X chromosome. *Amer. J. Hum. Genet.*, 1964, *14*, 135—148.
192. MALASSENET R. — Les groupes Sanguins Erythrocytaires, *Arch. Méd. de Normandie*, 1970, 2, 65—77.
193. MANTA I. — Biochimie, Ed. Did. Pedag. Buc., 1968.
194. MARCU I., TEITEL P., XENACHIS A. — Dozarea enzimelor eritrocitare. *Doc. Haemat.*, 1967, *79*, 3, 79—84.
195. MARTIN H., NOWICKI L. — Synthese, Struktur und Functions des Hämoglobins, Ed. J. F. Lehmanns — München, 1972.
196. MATHÉ G., AMIEL J. L. — Unicité ou pluralité des cellules souches hématopoïetiques. *Doc. Haemat.*, 1967, *15*, 1, 15—24.
197. MATOTH J., — Erythopoiesis (Regulatory Mechanisms and Developmental Aspects), Academic Press, Inc. London and New York, 1972.
198. MAWAS C., BURTIN P. — Les immunoglobulines humaines Structure Classification Introduction à la pathologie. *Rev. Prat.*, 1968, *18*, 11, 1647—1655.
199. MAYER S., MAYER G., WAITZ R. — Anatomie et histologie de la moelle osseuse. Encycl. méd. Chir. Paris, 1971.
199 a. MAYER M. M. — Le complément, *Med. Prisma*, 1975, 5, 5—36.
200. MC DONALD, DODDS A. T. C., GRUICKSHANK B. — Atlas der Hämatologie, Ed. Thieme, Stuttgardt, 1972.
201. MEMIN Y., PICARD P., DEBONNIERE C., BRUNEAUX I. — Une nouvelle observation d'accident cardio-vasculaire après ponction sternale, *Presse Med.*, 1969, *77*, 40, 1385—1386.
202. MESROBEANU I., BERCEANU ST. — Immunobiologie, imunochimie, imunopatologie, Ed. Acad. R.S.R., 1975.
203. METCALF D. — Clinical applications of the agar culture technique for haematopoietic cells. *Rev. Europ. Et. Clin. Biol.*, 1971, *16*, 655.
204. METCALF D., MOORE M. A. S. — Haemopoietic cells, Ed. North-Holland Publish Co., 1971.

Scanned with OKEN Scanner

205. MEUNIER P., ARON J., EDOUARD C., VIGNON G. — Osteoporose et involution adipeuse de la population cellulaire de la moëlle. *Presse Méd.*, 1970, 78, 12, 531—534.
206. MICHEL J. — Icteres à bilirubine conjugnées, *Journ. méd. Montpellier*, 1973, *8*, 3, 47—81.
207. MIHAESCO C. — Structure des immunoglobulines, *Path. Biol.*, 1967.
208. MILCU ŞT., MAXIMILIAN C. — Genetica umană, Ed. ştiinţifică, Buc., 1966.
209. MOENS S. R. — Le métabolisme de la bilirubine. *Nouv. Presse Méd.*, 1965, *73*, 36, 2049—2053.
210. MORARU I., ANTOHI Ş. — Introducere în genetica moleculară, Ed. Med., Bucureşti, 1966.
211. MOREL P., PERRIN-GENTILHOMME O. — Cytologie de l'érithropoïèse. *Cah. méd. lyonnais*, 1971, *47*, 36, 4015—4020.
212. MORETTI J. L., BOISSEAU M., VILAYLECK S., ETCHEBARNE G., BENTEGEAT J., BLANQUET P. — La cinétique du fer 59 chez l'home normal, *Bordeaux méd.*, 1972, 11, 1239—1245.
213. MORGAN T. H. — Bazele ştiinţifice ale evoluţiei. Impr. Centrală, Bucureşti, 1938.
214. MOULIAS R., BERTHAUX P. — Les groupes sériques humains, *Presse Méd.*, 1968, *76*, 52, 2467—2470.
215. MOULIAS R., BERTHAUX P. — Les populations cellulaires responsables de la réponse immunitaire. *Rev. Prat.* 1971, *21*, 6, 839—859.
216. MOURIQUAND C. — L'absorption intestinale et l'excrétion du fer. *Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, 1967, *7*, 2, 235—238.
217. MULLER G., NORTH M. L., KIRSTETTER L., DE MOT M., DEHALLEUX J. M., KUHN A., GANDAR R. — Le Figlu-test comme méthode d'appreciation dans la carence en acid folique dans les anémies gravidiques. *Rev. Franç. Gynec.*, 1970, *65*, 7—8, 403—407.
218. MURATORE R. — L'hématopoiese et ses modes courants d'éxploration, *Rev. Prat*, 1967, *17*, 9 bis, 1283—1324.
219. MURATORE R., FOA R., FOLLANA R., BAYLE J., OLMER J. — Anomalies morphologiques erythoblastiques et érythocytaires au cours des affections proliératives du tissu myéloide. *Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, 1973, *13*, 3, 339—344.
220. MUNTEANU N. — Stadiul actual al cunoştinţelor referitoare la patologia sintezei hemului, *St. cerc. med. int.*, 1968, *9*, 4, 303—317.
221. MUNTEANU N. — Contribuţii la diagnosticul insuficienţei măduvei osoase, Teză I.M.F. Bucureşti, 1971.
222. MURAYAMA M. — Molecular mechanism of red cell sickling, *Science*, 1966, *153*, 145.
223. NAJEAN J. — Étude de l'absorption du fer et résultats obtenus en pathologie, *Vie méd.*, 1972, 30, 3509—3514.
224. NAJEAN Y. — Physiologie de l'érythopoïèse, Ed Baillère, Paris, 1972.
225. NAJEAN Y., ARDAILLOU N., DRESCH C. — Utilisation des techniques isotopiques en hématologie, Ed. Baillère et fils, Paris, 1969.
225 a. NAJEAN Y., CACHIONE R., DRESCH C. — Intérêt de la mesure du volume globulaire dans les polyglobulies et les aménies, *Nouv. Presse méd.*, 1975, *4*, 19, 1413—1416.
226. NASS M. NI. — L'origine des mitochondries. Sont-elles des reliquants d'anciennes bactéries, *Triangle*, 1971, *10*, 1, 29—36.
227. NICOLAU C. T. — Hematologie, Ed. Medicală, Bucureşti, 1959.
228. NICOLAU C. T., NICOARĂ S. T. — Progrese în tehnicile hematologice uzuale, Ed. medicală, Bucureşti, 1966.
229. NIXON P. F., BERTINO J. R. — Interrelationship of Vitamin B_{12} and folate in man. *Amer. J. Med.*, 1970, *48*, 5, 555—569.
230. NORTH M. L., OBERLING F., MAYER S., WAITZ R. — Intéret clinique des techniques courantes d'exploration des protéines sériques. *Journ. Méd. Strasbourg*, 1971, 4, 295—302.

Scanned with OKEN Scanner

231. OBERLING FR., CAZENAVE J. P., WAITZ R. — Ultrastructure du tissu adipeux de la moelle hematopoietique normale du lapin. *Path. Biol.*, 1972, *20*, 7/8, 337—347.
232. O.M.S. — Les troubles génetiques: prevention, traitement et readaptation, Seria de rapoarte tehnice: N. 497, OMS, Geneva, 1972.
232 a. ORSINI A. — Les thalassémies, *Nouv. Presse Méd.*, 1973, *32*, 2, 2089—2092.
233. PADILLA F., BROMBERG P. A., JENSEN W. N. — The Sickle Unsikle cycle: A Couse of Cell Fragmentation Leading to Permanent y Deformed Cells, *Blood*, 1973, *41*, 3, 653—660.
234. PAGET M., HARTMANN L. — Les anemies, Ed. Expansion, Paris, 1967.
235. PALEK J., DOLEZALOVA M., MICHALEC C., FRIEDMANN B. — Rapports entre les modifications biochimiques des érythrocytes et leur phagocytose par des leucocytes in vitro, *Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, 1968, *8*, 2, 268—270.
236. PAULING L., ITANO H. A., SINGER S. Y., WELLS I.C. — Sickle cell anemia, a molecular disease, *Science*, 1949, *110*, 543.
237. PĂUN R., LUCA N., LUCA R. — Funcția imunologică a timusului, *Medicina Internă*, 1969, *21*, 6, 659—667.
238. PAVAN C. — Conception actuelles de la structure des chromotomes et de leur fonction, *Triangle*, 1964, *6*, 8, 287—293.
239. PEASE D. C. — Histological Techniques for Electron Microscopy, Ed. Academic Press New York and London, 1960.
240. PERUTZ M. F. — Stereochemistry of the cooperative effects in hemoglobine, *Nature*, 1970, *228*, 726.
241. PESCIA G. — Les examens de laboratoire en cytogénétique médicale, *Méd. Hygiene*, 1973, *31*, 1046, 325—329.
242. PHILIPPE N., REQUIN CH., GERMAIN D. — Nouvelles techniques d'étude des chromosomes, *Cah. méd. lyonnais*, 1973, *49*, 15, 1507—1522.
243. PIGUET H. — Structure des hémoglobines normales et anormales. II. Genetique des hémoglobines, *Presse Méd.*, 1968, *74*, 11, 519—521 și *76*, 19, 911—913.
244. PLAUCHU H. — Structure du chromosome, *Rev. Prat.*, 1974, *24*, 25, 2285—2306.
245. POLICARD A. — Elements de physiologie cellulaire, Ed. Masson, Paris, 1966.
246. POLLYCOVE M., MORTIMER R. — The quantitative determination of iron kinetics and hemoglobine synthesis in human subiects, *J. Clin. Invest.*, 1961, *4*, 753—782.
247. POLONOVSKI M. — Biochimie médicale, Ed. Masson, Paris, 1969.
247. a. POP D. POPA ION — Inima — patologie și tratament chirurgical. Ed. med. Buc., 1975.
248. POPESCU E. R. — Hematologie clinică, Ed. Medicală, București, 1966.
249. POPESCU E. A. — Patologie și terapeutică imunitară, Ed. medicală, București, 1971.
250. POPPA CECIL, NICOARĂ S., ENACHE FLORICA — Aspecte ale standardizării în hematologie, *Med. Int.*, 1968, *20*, 1, 65—71.
250. a. POPPA C., APĂTEANU V., NICOARĂ S., GRIGORIU G. — Puncție sternală sau iliacă, *Med. int.*, 1960, 3, 387.
251. POULET J., COMBRISSON A. — Histoire de l'étude de la cellule. *Conc. méd.*, 1974, *5*, 1, 101—107.
252. POZSGI N., GHYKA GR. — Immunogenetica, Ed. Acad., R.S.R., 1974.
253. PRICE JONES C. — Red cell diameters in one hundered healthy persons and in pernicious anemia: effect of liver treatment. *J. Path. Bact.*, 1926, 32, 479.
254. PRODANOV P. — Étude quantitative du système de groupes sanguins ABO, *Nouv. Revue Fr. Hématol.*, 1970, *10*, 19—40.
255. PREDESCU C., BRATU V., BĂLAN A., PRIȘCU R. — Hemoglobinoza S. *Pediatria*, 1967, *16*, 6, 531—536.
256. PROTIN P. — Porhyrines et porphyries, *Gaz. méd. France*, 1970, 77, 17, 3781—3790.
257. RACE R. R., SANGER R. — Les Groupes Sanguines chez l'homme, Ed. Masson, 1970.
258. RAICU P. — Genetică, Ed. Did. și Pedag., București, 1974.

Scanned with OKEN Scanner

259. RAICU P., IONESCU-VARO M., GANCEVICI G., MOISESCU G. — Celula, structură, ultrastructură şi funcţii, Ed. Acad. R.S.R., 1972.
260. RAIN J. D., DRESCH C., NAJEAN Y. — Bilan actuel des études scintigraphiques de la moëlle osseuse. *Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, 1973, *13*, 3, 390—397.
261. RAIN J. D., KUNTZ D., NAJEAN Y. — Importants progrès en scintigraphie osseuse grace à l'emploi de pyrophosphate de technetium (99 mTc). *Nouv. Presse Méd.*, 1973, *2*, 3, 186.
262. RAMOT BRACHA — Red Cell Structure and Metabolism, Academic Press, Inc, London and New York, 1971.
263. REVOL L., MOREL P. — Le myélogramme, *Encycl. Med. Chirurg. Sang.*, 1959, 13023 C.
264. RHODIN Y. A. G. — An Atlas of ultrastructure, Ed. Saunders Co Philadelphia and London, 1963.
265. RICHIR CL. — Ce qu'un practicien doit savoir de la cytologie, *Conc. méd.*, 1969, 17, 3589—3600.
266. ROBERT J-M. şi colab. — Recherche et déconvert du gène: structure du gène; physiologie du gène; physiologie des gènes humains; mutations géniques et mutations chromosomoques; histoire naturelle des maladies d'origine génetique, *Rev. Prat.*, 1974, *24*, 25, 2207—2284 şi 1974, *24*, 39, 3991—3426.
267. ROBERT M. — Affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène, *Bul. Physiopath. résp.*, 1975, *11*, 1, 79—170.
268. ROCHANT H., DREYFUS B., SULTAN C. — Physiopathologie de l'absorption du fer, *Nouv Rev. Fr. d'Hématol.*, 1967, 7, 2, 239—258.
269. ROPARTZ C. — Immunoglobulines humaines et fonctionnement génétique, *Rev. Transfusion*, 1969, *12*, 1, 85—96.
270. RORTH M., ASTRUP A. — Oxygen Affinity of Hemoglobin and Cell Acid Base Status, Ed. Academic Press, Inc. London and New York, 1972.
271. ROHR K. — Das menschliche Knochenmark, Ed. G. Thieme, Stuttgart, 1960.
272. ROSA Y., WACJMANN H., BEUZARD Y. — Structure des hémoglobines normalles, *Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, 1971, *11*, 33.
273. RUFFIE J., VERGNES H. — Hémoglobines et anomalies de la synthèse hémoglobinique, *Rev. Méd. Toulouse*, 1971, 7, 639.
274. ROZEN P. — Controlul de calitate al tehnicilor hematologice de laborator, *Viaţa med.*, 1970, *17*, 3, 123—126.
275. RUSSE G. — Aspecte biofizice ale microcirculaţiei, *Viaţa med.*, 1970, *17*, 291—296.
276. SALMON CH. — Les phénomènes immunitaires en hématologie, *Rev. Prat.*, 1972, *22*, 14, 2199—2211.
277. SALSBURY A. J., CLARKE J. A. — Aspects de la surface des éléments figurés du sang, *Triangle*, 1968, *8*, 7, 260—266.
278. SARAGEA M., CHIMION, ROTARU N. — Noţiuni de immunologie, *Viaţa méd.*, 1971, *18*, 11, 12, 13, 16 şi 17.
279. SĂSĂRMAN M. — Hemoglobina: structură, funcţie, actualităţi, *Spitalul*, 1968, *81*, 4, 299—306.
280. SCHAPIRA G. — Elements de biochimie générale, Ed. Flammarion, Paris, 1973.
281. SCHAPIRA G., KRUH J., LABIE D., MALEKNIA, BLUM N. — Le contrôle génétique de la biosynthèse de l'hémoglobine et ses anomalies, *Ann. Méd. Int.*, 1970, *121*, 6—7, 619—623.
282. SCHMERSO H. — Cercetări experimentale asupra hemolizei mecanice, *Z. für Artz.*, 1959, 2, 99.
283. SCHMID-SCHÖBEIN HOLGER, WEISS J., LUDWIG H. — A simple Method for Measuring Red Cell Deformability in Models of the Microcirculation, *Blut*, 1973, *26*, 6, 369—379.
284. SCHNER J. H. — Mozaicism şi pseudomozaicism eritrocitar la deficienţii în glucozo-6-fosfat-dehidrogenază, *Med. int.*, 1968, *20*, 7, 863—868.
285. SELIGMANN M., KLEIN M. — Structure et activité biologique des immunoglobulines humaines, *Rev. Prat.*, 1971, *21*, 6, 883—901.

Scanned with OKEN Scanner

286. SERAFIMOV-DIMITROV W., NEDELKOVA M. — Über den Mechanismus der Erythrophagozytose nach der Transfusion von heterogen Erythrozyten. Haematologia Budapest, 1969, *3*, 4, 419—423.
287. SERINGE PH., HOEFFEL J. C., KAPLAN J. C., ROSA — La glucose-6-phosphate-déshydrogénase en clinique: déficit enzymatique et variantes qualitatives, *Sem. Hôp. Paris*, 1968, 19, 1269—1276.
288. SHEPP M., TOFF H., YAMADA H., GABUZDA T. G. — Heterogeneous Metabolism of Marrow Ferritins during Erythoid Cell Maturation, *Brit. J. Haemat.*, 1972, *22*, 4, 377—382.
289. SHERLOCK S. — Aspects nouveaux de la physiopathologie de l'ictère, *Triangle*, 1964, *6*, 4, 139—144.
290. SILBER R., MOLDON C. F. — The Biochemistry of B_{12} mediated reactions in man, *Amer. J. Med.*, 1970, *48*, 5, 549—554.
291. SIRS J. A., STILINSKI C. — Structure of the red blood cell membrane, *Micron*, 1971, *2*, 5, 382—388.
292. SKARBERG K. O. — Cellulary and cell proliferation rates in human bone marrow, *Acta Med. Scand.*, 1973, 1—31.
293. SMIEJAN J. M. — L'Hémolyse, *Gaz. Méd. de Fr.*, 1972, *79*, 18, 3129—3136.
294. SORKIN E. — La chimiotaxie des phagocytes. *Méd. Hyg.*, 1970, *905*, 225—229.
294. a. SOUILLET G., GERMAIN D., CARRAZ M., VEYSSEGYRE C., FROBERT Y. — Phagocytose et bactéricidie normalles du polynucléaire neutrophile, *Sem. Hôp. Paris*, 1975, 25, 1689—1700.
295. SPELBERG T. C. — La fonction des histones, *Triangle*, 1974, *13*, 4, 151—164.
296. STEOPOE I. — Citologie, histologie, embriologie, Ed. did. pedag. Buc., 1967.
297. STEINBERG A. G., BEARN A. G. — Progress in Medical Genetics, Ed. Grune and Stratton, London, 1972.
298. STOHLMAN F. jr. — La régulation de l'erythropoiese, *Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, 1964, *4*, 3, 341—346.
299. STOLL CL. — La caryotype et ses indications. Chromosomes et hémopathies, *France Méd.*, 1971, 7, 5—34.
300. STREIFF F. — Hémolyse, *Encyclop. Méd. chir. (Sang)*, 1970, 13000 E 35.
301. STREIFF F., PETERS A. — Metabolisme du fer, *Encyclopédie Méd.-Chir., Paris (Sang.)*, 1970, 13000 E 25.
302. STREIFF F., PETERS A. — Utilisation des isopes en hématologie. *Encyclop. Méd. Chir. (Sang.)*, 1968, 13000 M 10.
303. SURGENOR D. MCN. — The Red Blood Cell, Acad. Press New York, San Francisco, London, vol. I, 1974, vol. II, 1975.
304. TAVASSOLI M., CROSBY W. H. — Bone Marrow Histogenesis: A Comparison of Fatty and Red Marrow., *Science*, 1970, *169*, 291—293.
305. TEITEL P. — Le test de la filtrabilite erythrocytaire (T.F.E.) — Corrélation entre les caractéristiques microrgéologiques (filtrabilité) des globules rouges et leur séquestration splénique et hépatique, *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, 1967, *7*, 2 şi 3, 195—214 şi 321—328.
306. TEITEL P. — Probleme actuale ale conservării sîngelui; consideraţii din punctul de vedere al capacităţii funcţionale a eritrocitelor, *Doc. Haemat.*, 1969, *113*, 2, 113—127.
307. TEITEL P., XENACHIS AGRIPINA, MARCU I. — Investigaţia clinică a factorilor hemoreologici în fiziopatologia anemiilor hemolitice. Referat, *A III-a Conf. Naţ. de Hemat.*, Buc., 1972.
308. TEODORESCU EXARCU — Patologie biochimică, Ed. Med., Bucureşti, 1974.
309. THOMPSON A. — Short Textbook of Haematology. Ed. Pitman Medical Publ. London, 1975.
310. TORLONTANO G., FONANA L., LEURENZI A. de., PAPA G., PROIETTI M. — Hereditary Elliptocytosis (Haematological and Metabolic Findings), *Acta Haemat.*, 1972, *48*, 1, 1—11.
311. TRAEGER J., ZECH P., REVILLARD J. P., MANUEL Y. — Excrétion rénale du fer et protéinurie, *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, 1967, 7, 2, 295—300.
312. TRUBOWITZ S., BASEK B. — The Structural Organization of the Human Marrow Matrix in Thin Section, *Amer. J. Clin. Path.*, 1970, *53*, 6, 908—913.

Scanned with OKEN Scanner

313. TUBIANA M. — La cinétique de la prolifération cellulaire, Ed. INSERM, Paris, 1971.
314. TUBIANA M., PARMENTIER C., FRAGU P., JAMMET H. — L'excrétion du fer, *Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, 1967, 7, 2, 288—294.
315. TURA S., RICCI-BITTI M. L., BACCARANI M. — Remarques sur les relations du pancrèas exocrine avec l'absorption digestive du fer, *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, 1967, 7, 2, 284—286.
316. TURPIN F. — Contenu en hémoglobine des erythroblastes humains aux différents stades de maturation. Étude par microspectrophotométrie, *Nouv. Rev. Fr. Hématol.*, 1970, *10*, 6, 747—754.
317. UNDRITZ E. — Plauches d'Hématologie, Ed. Sandoz, 1972.
318. URSEA CONSTANȚA — Contribuții la studiul comparativ între frotiu, amprentă și secțiune de măduvă în hemopatii, *Teză, I.M.F. București*, 1974.
319. VANDRELY COLETTE — Les lymphocytes et les deux types d'immunité, *Rev. Méd.*, 1973, *24*, 1607—1614.
320. VANETTI A., BOUSQUET M. — Les valves artificielles, *Conc. méd.*, 1972, 30, 9, 6239—6242.
321. VERNANT P., BAYARD J. P., SULTAN C., LAINEE R., ARIE E., ACAR J. — Étude de l'hémolyse intravasculaire chez les malades porteurs de prothèse valvulaires, *Ann. Méd. Int.*, 1971, *122*, 4, 517—524.
322. VEVERA V. — Date actuale asupra depozitării normale și patologice a fierului. *Med Internă*, 1967, *19*, 2, 141—149.
323. VIALA J. J., BRBIER Y., DECHAVANNE M. — Intret de l'étude de la cinétique du radio-fer en hématologie, *Cah. méd. lyonnais*, 1969, *45*, 3391—3409.
324. VIALA J. J., DECHAVANNE M. — Cinetique de l'érythropoïèse, *Cah. méd. lyonnais*, 1970, *46*, 41, 3457—3465.
325. VÎLCU AL. — Contribuții experimentale asupra hemolizei mecanice, *Șt. cercet. med. int.*, 1960, 5, 601—608.
326. VÎLCU AL. — Technique nouvelle de biopsie osseuse, *Nouv. Rev. Fr. Hematol.*, 1977, sub tipar.
327. VÎLCU AL., MARCU I., XENACHIS A. — Deficit eritrocitar de gluco-6-fosfat dehidrogenază la o familie din județul Teleorman, *Doc. Haemat.*, 1972, 2, 67—73.
328. VÎLCU AL., XENAKIS AGRIPINA, HOSSU T., MARCU I., CÂMPEANU LUCIA — Studiul eritropoiezei splenice cu radioizotopi și policitemia vera complicată cu mieloscleroza, Simpozionul național „Fiziopatologia splinei", Cluj, 10—12. V. 1973.
329. VÎLCU RODICA — Termodinamica chimică, Ed. tehnică, Buc. 1976.
330. VLAICU R. — Stereoscanul, Știința și tehnică, 1971, 70—74.
331. WAITZ R. — Actualités en Transfusion Sanguine, Ed. Masson, Paris, 1967.
332. WAITZ R., MAYER S. — L'éxploration de la moëlle osseuse, étude cytologique et histologique, Ed. Masson, Paris, 1967.
333. WAITZ R., MAYER G., MAYER S. — De certaines lésions élémentaires de la moelle osseuse. *Al. V-lea Congres Europ. Hematol.*, 1955, Ed. Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1956.
334. WATSON J. D., CRICK F. H. — The structure of DNA, *Cold. Spring, Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1953, 18.
335. WATSON J. D. — Biologia moleculară a genei. Ed. științifică, București, 1974.
336. WEED R. I. — The importance of erythrocyte deformability *Amer. J. Med.*, 1970, *49*, 2, 147—150.
337. WEED R. I., YAFFÉ E. R., MIESCHER P. A. — The red cell membrane, Ed. Grune and Stratton, New York, and London, 1971.
338. WEISS L. — A Scaning Electron Microscopic Study of the Spleen, *Blood*, 1974, *43*, 5, 665—691.
339. WELLS ROE — The Microcirculation in Clinical Medicine, *Acad. Press. Inc New York and London*, 1973.

Scanned with OKEN Scanner

340. WHEBY M. S. — Regulation of iron absorption. Gastroenterology, 1966, 6, 888—891.
341. WILLIAMS W. J., BEUTLER E., ERSLEV A. J., RONDLES R. W. — Hematology, Ed. Mc. Graw-Hill Book Company and Blakiston Publications, 1972.
342. WINTROBE M. — Clinical Hematology, Ed. H. Kimpton, 1967.
343. XENAKIS A., MARCU I., TEITEL P. — Studiul talasemiilor cu izotopi radioactivi, *St. cerc. med. int.*, 1970, *11*, 5, 405—412.
344. YUNIS J. J. — Biochemical Methods in Red Cell Genetic, *Acad. Press. Inc. London and New York*, 1969.
345. ZAMBONI L., PEASE D. — The vascular bed of red bone marrow, *J. Ultrastr. Res.*, 1961, *5*, 65.
346. ZAMFIRESCU-GHEORGHIU M. — Izoenzime în patologie, Ed. med. Buc., 1970.
347. ZANJANI E. D., McLAURIAN W., GORDON A. S., RAPPAPORT J. A., GIBS J. M., GILDARI A. S. — Biogenesis of Erythropoietin. Rol of the substrate for Erythogenin. J. *Lab. clin. Med.*, 1971, *71*, 751—758.
348. ZITTOUN R., ZITTOUN J. — Les transcobalamine, Nouv. *Presse méd.*, 1973, *2*, 14, 919—924.
349 ZOLOTNIȚKAIA R. P. — Numărarea eritrocitelor și leucocitelor cu ajutorul celoscopului (Trad. C.D.M.) *Laboratornoe Delo* (Moscova), 1962, 7, 16.

Scanned with OKEN Scanner

ERATA

Pagina	Rîndul	În loc de	Se va citi
270	12 de sus	porfirină	porfină
274	12 de sus	$NH_2—CH_2—CO—CH_2—COOH$	$NH_2—CH_2—CO—CH_2—CH_2—COOH$
293	6 de sus	25 cm	2,5 cm
340	1 de jos	450 ×).	450 000 ×).
400	15 de jos	Eritrocitele care	Sferocitele, care

Scanned with OKEN Scanner